



Echappement à la chimiothérapie et émergence de cellules plus agressives : Importance de l'hétérogénéité tumorale

Barbara Jonchère

► To cite this version:

Barbara Jonchère. Echappement à la chimiothérapie et émergence de cellules plus agressives : Importance de l'hétérogénéité tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0008 . tel-01228521

HAL Id: tel-01228521

<https://theses.hal.science/tel-01228521>

Submitted on 13 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

Barbara JONCHERE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé
Discipline : Biologie Cellulaire

Soutenue le : lundi 8 décembre 2014
Thèse N° : 1430

ECHAPPEMENT A LA CHIMIOThERAPIE ET EMERGENCE DE CELLULES PLUS AGRESSIVES

Importance de l'hétérogénéité tumorale

JURY

Rapporteurs : **Isabelle DUSANTER-FOURT**
Stéphane ANSIEAU

Directrice de Recherche INSERM, Paris
Chargé de Recherche, INSERM, Lyon

Examineurs : **Eric LELIEVRE**
Olivier COQUERET

Maitre de Conférence, Université d'Angers
Professeur, Université d'Angers

Invité : **Philippe JUIN**

Directeur de Recherche, INSERM, Nantes

Directeur de Thèse : **Olivier COQUERET**

Professeur, Université d'Angers, Angers.

REMERCIEMENTS

Je remercie dans un premier temps les membres de mon jury de thèse et particulièrement le Dr Isabelle Dusanter-Fourt et le Dr Stéphane Ansieau pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de ce manuscrit. Merci aussi au Dr Eric Lelièvre, le président du jury, et au Dr Philippe Juin d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes sincères remerciements vont au Pr Olivier Coqueret, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui, en tant que directeur de thèse, m'a encadrée durant ces années. Je le remercie pour sa disponibilité et pour la confiance qu'il m'accorde. Merci également de m'avoir permis de participer au congrès Genes & Cancer qui a été très enrichissant.

Merci au Dr Arnaud Vigneron et au Dr Yves Delneste pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse et avoir contribué à l'évolution de mon projet.

Merci également au Dr Catherine Guette pour la dimension protéomique qu'elle apporte au laboratoire. Merci pour les petites mises au point biochimiques lors des réunions et pour sa sympathie.

Mes remerciements vont aussi au Pr Alain Morel et au Dr Michèle Boisdron Celle.

Merci à tous les membres actuels et passés de l'équipe qui m'ont apportés chacun à leur façon : compétences, aides, réconfort et rires presque au quotidien et qui sont pour beaucoup plus que des collègues!

Merci au duo formé par Elisa Ravon et le Dr Laurence Preisser pour m'avoir accueillie au labo et pour m'avoir initiée respectivement à la cytométrie et à la PCR quantitative. Laurence, merci aussi pour les dépannages de produits!

Je remercie le Dr Sophie De Carné et le Dr Hélène Sellier pour leur aide aussi bien d'un point de vue expérimental que dans la correction des mémoires au cours de mes années de master. Votre réussite est un modèle pour moi.

Merci à toi Chacha de m'avoir accompagnée et aidée au commencement de ma thèse. Tu m'as transmis une rigueur certaine. Ca me fait rire maintenant mais au début, j'ai souvent craint de t'entendre crier après moi. D'un autre côté, ton expressivité rend ta bonne humeur franchement communicative. Merci pour les conseils astucieux pour la vie de tous les jours que tu nous livres à foison! Tu es dotée d'une volonté et d'un dynamisme rare et je te souhaite de trouver le boulot de tes rêves où tu excelleras j'en suis sûre.

Merci aux deux précédents Dr du labo Damien et Audrey. Vos précieux conseils «manips» et «démarches administratives» m'auront accompagnés presque jusqu'au bout. Damien, ton calme en toutes circonstances nous a apporté une sérénité certaine. Je me souviens de discussions enrichissantes en culture et pendant les pauses déjeuner, merci pour ta grande sympathie! Audrey, je n'oublierai pas les supers moments passés ensemble et le son de ta voix si douce surtout dans les notes les plus aiguës. Un grand merci aussi pour nous avoir aussi bien intégrées, avec Clémence, à ton équipe de basket: deux années géniales! Allez Trélazé!!! Je vous souhaite bonne route à tous les deux et j'espère qu'on se reverra aussi souvent que possible.

David, tu as apporté un vent de fraîcheur et de rigueur au labo. J'ai de très bons souvenirs de discussions sérieuses et moins sérieuses. Tu es d'ailleurs doté d'un véritable don d'imitation comique! Je te dois les délires sur Max Boublil enfin je crois, je ne me souviens même plus exactement comment ça a commencé! Depuis que tu es parti je n'ose même pas imaginer le nombre de cheveux blanc qui s'accumulent sur ma tête! J'en profite aussi pour te souhaiter une excellente reconversion. Avec Audrey, vous formez un duo glamour et déjanté et je n'oublierai pas le mémorable dîner d'anniversaire que vous m'avez organisé. J'espère avoir vent de la naissance de Ping, Pang et Pong dans les prochaines années!

Alexandra, notre serial blotteuse, merci pour tes encouragements réguliers, tu as souvent eu les mots pour me rebooster. Coach dans l'âme, les séances de sport en ta compagnie m'ont beaucoup aidées à décompresser même si elles ont été plus sporadiques pour moi ces dernières semaines! Ta force de caractère dans la vie m'impressionne. Nous partageons quand même une tare... tu la devines... le manque de personnalité!!! Je me relis et je trouve ça un peu contradictoire mais bon.... tu es habituée...! Merci aussi pour les délires partagés du vendredi : complètement HS le rire s'invite souvent sans la moindre raison!

Julien, voisin de bureau et de paillasse, j'apprécie ta franchise et ton sens critique. Véritable bulldozer de la science, ta grande sensibilité vient en contraste. Tu as souvent su m'amener sur des terrains glissants et me pousser malgré moi à sortir des vannes plutôt osées... pour t'en offusquer quelques minutes plus tard! S'en ai suivi des parties de franches rigolades qui me font encore sourire maintenant. Tu n'es plus le même depuis quelques temps, je te souhaite de retrouver la flamme dans ce milieu ou dans un autre.

Marie ou Mme Bricole tout, tu as toujours plus d'une astuce dans ton sac. Ta créativité et ton ingéniosité sont tes atouts! Au quotidien, j'ai vraiment apprécié ta bonne humeur, ta générosité et ton sens du groupe. Avec ta grande autonomie, tu as fait une parfaite première stagiaire! Je me souviens de très sympathiques soirées rue cubain et plus récemment à Avrillé. Merci aussi pour nous avoir fait découvrir ta Picardie natale lors d'un week-end épique!

Alexis, jeune papa branché, tant au labo que dans la vie, tu suis sur les traces de Damien, et tu es superbement bien parti! La fertilité des adeptes de la protéo est à relever! Mais qu'y a-t-il vraiment dans vos produits puants? Merci pour ces faits divers ou anecdotes à dormir debout que tu nous fait partager presque tous les midis et qui sont parfois source de petits débats et de rires.

Alice, point d'ancrage de la protéo, tu en as vu défiler des thésards au labo! Avec Nico, vous êtes toujours là pour donner un coup de main. Je garde un super souvenir de vous en Yoda et Chewbacca lors de la préparation de la vidéo «Star Wars» pour Damien! Mémorable! Merci pour les très sympathiques barbecues partagés avec tout le monde!

Sophie, presque toujours souriante, excepté quelques vendredi matin, je te remercie pour tes conseils en biologie moléculaire et ta joie de vivre contagieuse! Tu es la reine du punch qui met tout le monde d'accord avec ses fruits bien corsés!

Simon, tu t'es distingué par ton grand sens de l'humour et tes dons de dessinateur. Je te revois encore en poule avec ton gant sur la tête. On a partagé de mémorables parties de tarot sur le coin de pelouse mine de rien très ensoleillé du CPP. Le jeu de cartes que tu nous as laissé vit toujours dès que le temps le permet. Merci aussi pour nous avoir fait découvrir, avec Arnold, ta ville de Montpellier lors d'une belle journée d'été!

Cécile, maitresse du FACS, ton aide expérimentale m'a été précieuse. Nous avons aussi partagé la galère des mises au point. De temps en temps, soupape de décompression, la pièce du FACS nous a vu dans des bons et mauvais moments. Merci pour ton écoute, tes encouragements et ta grande sympathie. Je n'oublie pas que tu es notre marraine de «Physic Form». Tu nous as montré la voie!

Bertrand, discret et efficace, tu as joué un rôle déterminant dans la finalisation de notre article! En effet, avec le recul, je me rends compte qu'en peu de temps et malgré les galères, les expériences de tri, d'agar et les manips in vivo ont été plutôt productives grâce à toi. On a formé une bonne équipe! Merci beaucoup pour ça! Plus légèrement, j'apprécie vraiment ton sens de l'humour très scindant... Merci aussi à Catherine Guillet de la plateforme de tri cellulaire qui nous a accordés de son temps.

Pauline, Méline, Camille, Clémence, Marine, Quentin, stagiaires de passage au labo, merci pour votre contribution aux projets et votre sympathie.

Merci à tous ceux qui m'ont aidés à corriger ce manuscrit. Bien évidemment merci à toi Olivier pour le temps que tu as passé et pour toutes les améliorations que tu m'as suggérées. Merci à Alexandra, Marie et mes parents pour la correction de l'orthographe.

Merci également aux membres du service d'oncopharmacologie dont Marie-Claire, Julie, Luc, Vincent, Audrey, Sabrina, Adélaïde, Nadège, Catherine, Marie avec qui nous partageons de très agréables pauses café agrémentées de petites douceurs faites maison ou non.

J'ai également une grosse pensée pour ceux qui m'ont amenés jusqu'à la thèse alors que mon but premier était de faire des études courtes... Au lycée, j'ai adoré la bio grâce à Mr Ferreira. Quelques années plus tard, c'est dans le laboratoire du Dr Laurent Marsollier que j'ai fait mes premiers pas dans la recherche, une révélation. J'en profite pour le remercier de m'avoir donné l'impulsion et l'envie d'aller plus loin. Et comme un clin d'oeil, il était présent lors de mon attribution de bourse de thèse. Bien avant ça, la confirmation de cette vocation s'est faite dans le laboratoire de virologie du Pr Flore Rozenberg. Un grand merci à elle et au Dr Hélène Laude pour ce stage sur le carcinome de Merkel qui m'a tellement apporté.

Merci à Clémence, Marion et Ivan, Mélanie et Clément, Hélène, Charles et Laurena, Justine et Stève, Huguette et Grégoire, Alphonsine, Sympho, Mélanie, Maud, Marion et Julien, Pauline, et Charlie pour leurs encouragements et les moments très sympathiques passés ensemble en soirée, au basket, sur des rythmes de salsa, à notre mariage, au tien ma juju, lors de dimanches en famille, au téléphone vue la distance qui nous sépare, à préparer un autre mariage au soleil, à fêter l'arrivée de l'adorable Chloé, sous la pluie à distribuer des tracts (j'abuse c'est arrivé qu'une seule fois!! mais c'est parce que j'ai vraiment apprécié!), ...

Un grand merci à mes parents qui m'ont aidés à tous point de vue. Vous m'avez permis de suivre la voie qui me plaisait et vous m'avez transmis à la fois un sens de l'engagement, de la persévérance et un sens critique qui m'ont beaucoup servis. Merci pour vos encouragements et toutes les petites attentions qui m'ont boostées pendant ces années.

Arnold, lorsque je t'ai rencontré j'ai modifié ma trajectoire et sans toi, c'est certain, je n'en serais pas là. Dans ta vision de la vie tout est possible. Quand je doute, quand je me mets des barrières psychologiques, c'est cette idée qui me fait avancer et qui me donne envie de toujours aller plus loin. C'est surtout pour ça que je veux te remercier ici et que je te dédie cette thèse.

La chimiothérapie est souvent associée à une dénaturation du corps humain. Elle est même parfois considérée comme plus néfaste que bénéfique. L'idée de travailler pour une meilleure compréhension du fonctionnement de ces molécules, si infime soit ma contribution, m'a souvent aidée à aller de l'avant. C'est pour cette raison que je dédie également cette thèse à mes grand-parents.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION GENERALE	15
1.1. Echappement aux voies de suppression tumorale : origine et progression métastatique du cancer colorectal.	16
1.1.1. Le cancer colorectal résulte d'une succession d'altérations génétiques et épigénétiques.	16
1.1.1.1. Généralités sur le cancer colorectal.	16
1.1.1.2. Des formes sporadiques et héréditaires.	17
1.1.1.3. Gènes touchés par les altérations génétiques.	17
1.1.1.4. Différents types d'instabilité génétique dans le cancer colorectal.	19
1.1.1.5. Rôle de la sélection naturelle, darwinienne.	20
1.1.2. Origine tissulaire et cellulaire du cancer colorectal.	22
1.1.2.1. Organisation et fonctions normales du côlon et du rectum.	22
1.1.2.2. Modulation de la prolifération des cellules cryptiques et de leur différenciation.	25
1.1.2.2.1. La voie WNT régule le fonctionnement des cellules souches LGR5+.	25
1.1.2.2.2. La voie Notch à l'interface entre prolifération et différenciation le long des cryptes de Lieberkühn.	28
1.1.2.2.3. La voie BMP régule la différenciation des cellules cryptiques.	30
1.1.2.2.4. Les signalisations WNT, Notch et BMP définissent la structure de la crypte et l'équilibre entre cellules souches et cellules matures.	32
1.1.2.3. Les cellules souches à l'origine du cancer colorectal?	33
1.1.2.3.1. Le modèle stochastique et le modèle hiérarchique.	33
1.1.2.3.2. Origine du concept de cellules souches cancéreuses dans les leucémies.	34
1.1.2.3.3. Adaptation au tumeur solide, l'exemple du cancer colorectal.	35
1.1.2.3.4. La plasticité cellulaire et l'influence du micro-environnement : Vers un retour au modèle stochastique?	37
1.1.3. Progression du cancer, caractéristiques des cellules métastatiques.	40
1.1.3.1. Itinéraire des cellules métastatiques, caractère passif et actif du processus métastatique.	40

1.1.3.2. Perte d'interaction cellule/cellule : la transistion épithélio-mésenchymateuse (EMT).	41
1.1.3.3. Bourgeonnement cellulaire : rôle des protéines de la famille Rho et des métallo-protéases matricielles.	43
1.1.3.4. Modification de l'interaction cellule/matrice extra-cellulaire et résistance à l'anoikis.	45
1.1.4. Conclusion : L'hétérogénéité tumorale des cancers colorectaux doit être prise en compte dans les nouvelles stratégies thérapeutiques.	48
1.2. Déterminants de la réponse à la chimiothérapie : de la détection des dommages à l'induction des mécanismes de mort cellulaire.	50
1.2.1. Les chimiothérapies dans le traitement du cancer colorectal.	50
1.2.1.1. Place de la chimiothérapie dans la prise en charge du patient.	50
1.2.1.2. Place des molécules génotoxiques dans la chimiothérapie du CCR.	50
1.2.1.3. Zoom sur les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I.	52
1.2.1.3.1. Historique et utilisation des inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I.	52
1.2.1.3.2. Génération des dommages de l'ADN.	52
1.2.1.3.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase I ciblent les cellules proliférantes.	53
1.2.2. Réponses cellulaires associées aux dommages de l'ADN.	54
1.2.2.1. Détection des dommages de l'ADN.	54
1.2.2.2. Réparation des dommages de l'ADN.	55
1.2.2.3. Arrêt du cycle cellulaire, les différents points de contrôle du cycle cellulaire et leurs défaillances.	56
1.2.2.3.1. Points de contrôle au niveau de la transition G2/M.	56
1.2.2.3.2. Points de contrôle pendant la mitose.	59
1.2.2.3.3. Point de contrôle post-mitotique pour les cellules tétraploïdes.	63
1.2.2.4. Mécanismes de mort cellulaire induits par la chimiothérapie.	65
1.2.2.4.1. Le processus apoptotique.	65
1.2.2.4.2. La Sénescence.	71
1.2.2.4.3. Le dilemme apoptose/sénescence, p53 au centre du débat.	79
1.2.3. Conclusion : L'hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie doit être étudiée pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.	82

2. BUT DU TRAVAIL	84
3. RESULTATS	86
3.1. L'échappement à la sénescence, induite par l'irinotécan, est associé à l'acquisition de la résistance à l'anoikis.	86
3.1.1. Suite au traitement par l'irinotécan, les mécanismes d'apoptose ou de sénescence sont induits.	86
3.1.2. Des cellules échappent à la sénescence induite par le sn38, les cellules persistantes sont composées de cellules proliférantes et sénescents.	88
3.1.3. Le phénomène de persistance n'est pas spécifique au sn38, il est aussi observé en réponse à l'oxaliplatine.	92
3.1.4. Les cellules persistantes sont constituées d'un mélange de cellules polyploïdes, tétraploïdes et diploïdes.	93
3.1.5. Le traitement permet l'acquisition d'une résistance à l'anoikis qui est augmentée chez les PLCs.	94
3.2. L'émergence des PLD et la résistance à l'anoikis dépendent des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.	98
3.2.1. La salinomycine, ne bloque pas l'échappement à la sénescence ni la résistance à l'anoikis.	98
3.2.2. Les facteurs d'EMT Slug et Zeb1, exprimés suite au traitement sn38, ne participent pas à la résistance à l'anoikis.	102
3.2.3. Les facteurs de survie Bcl-xL et Mcl-1 sont nécessaires à l'échappement à la sénescence et à la croissance en faible adhérence.	105
3.2.3.1. Expression de la famille Bcl-2 en réponse au traitement.	105
3.2.3.2. La survie des cellules LS174T traitées par le sn38 dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.	106
3.2.3.3. L'émergence des PLD dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.	109
3.2.3.4. La résistance à l'anoikis des PLCs dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.	110
3.3. Parmi les PLCs, les PLD et les PLS enrichies, expriment de façon différente Mcl-1 et Bcl-xL et n'ont pas la même capacité de croissance en faible adhérence	112
3.3.1. Les PLCs sont constituées de PLD et de PLS qui peuvent être enrichies selon leur granulométrie et leur taille.	112
3.3.2. Les PLD sont diploïdes et les PLS sont majoritairement tétraploïdes.	115
3.3.3. Les PLS enrichies, sont nécessaires à la résistance à l'anoikis.	115

3.3.4. Les PLD et les PLS expriment de façon différente les protéines Mcl-1 et Bcl-xL	117
3.3.5. L'inhibition de p21 limite l'émergence des PLD et la résistance à l'anoikis.	118
3.4. Résumé des Résultats obtenus	120
3.5. Publication soumise	121
4. DISCUSSION	122
4.1. Les lignées colorectales répondent différemment au traitement.	122
4.2. L'échappement à la sénescence et l'augmentation de l'agressivité tumorale sont induits en réponse au traitement.	123
4.3. Les protéines Mcl-1, Bcl-xL et p21 sont impliquées dans l'échappement à la sénescence et dans la résistance à l'anoikis.	125
4.4. Des cellules souches cancéreuses à l'origine des PLD?	129
4.5. Les cellules sénescents créent un environnement favorable à la transformation, coopération entre cellules sénescents et cellules proliférantes	132
4.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques : limiter l'hétérogénéité de réponse au traitement et limiter l'induction de la sénescence	134
5. SUPPLEMENT	136
6. BIBLIOGRAPHIE	137

ABREVIATIONS

5-FU	5 FluoroUracile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP/ATP	Adénosine Di/TriPhosphate
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AKT	PKB protéine kinase B
ALDH	ALdehyde DeHydrogenase
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ARF	Alternative Reading Frame
ARN	Acide RiboNucléique
ASCL2	Achaete-Scute Complex Like 2
ASK1	Apoptosis- Signal-regulating Kinase 1
ASPP	Apoptosis Stimulating Proteins of P53
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATOH1	ATOnal Homolog 1
ATR	Ataxia Telangiectasia and RAD3-related
AXIN2	AXis INhibition 2
BCL-2	B-Cell Lymphomas 2
BH domain	BCL-2 Homology domain
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2
CAK	CDK activating kinase
Caspases	Cysteine dependent aspartate driven proteases
CCR	Cancer colorectal
CDC20	Cell-Division Cycle protein 20
CDC25	Cell-Division Cycle protein 25
CDH1	CDc20 Homologue-1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
Chk	CHeckpoint Kinase
CIC	Cellule Initiatrice de Cancer
CIN	Chromosomal INstability
CK1	Casein Kinase 1
CPC	Chromosomal Passenger Complex
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
CYTC	CYTochrome C
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DDR	DNA-Damage Response

DLL	Delta-like
DNA-PK	DNA Dependant Protein Kinase
E2F	E2 promoter binding Factor
E-cadhérine	Epithelial-cadherin
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EphB2/3	Ephrin type-B receptor 2/3
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBW7	F-Box and WD repeat domain- containing 7
FDA	Food and Drug Administration
Fox3A	Forkhead box transcription factor-3A
FSC	Forward SCatter
Fzd	Frizzled»
GDP/GTP	Guanosine Diphosphate/Guanosine TriPhosphate
GFP	Green Fluorescent Protein
GRO1	Growth-Regulated Oncogene 1
GSK3-β	Glycogen Synthase Kinase-3beta
HES	Hairy-Enhancer of Split
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HR	Homologous Recombination
IC50	Inhibitory Concentration 50%
IFN-γ	InterFeroN gamma
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
ILK	Integrin-Linked Kinase
INK4	Inhibitory cyclin associated kinase 4
JAG	JAGged
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LEF/TCF	Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor
LGR5	Leucine-rich repeat containing G protein coupled Receptor 5
LRP5/6	Low density lipoprotein Receptor related Protein 5/6
MAPK	Mitotogen Activated Protein Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	MisMatch Repair
MMPs	Matrix Metallo-Proteinases
MOMP	Mitochondria Outer Membrane Permeabilisation»
MSH2	MutS Homolog 2
NFκ-B	Nuclear Factor-Kappa B
NHEK	Non Homologous End-Joining

NICD	Notch IntraCellular Domain»
NK	Natural Killer
NOD/SCID	NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
OIS	Oncogene Induced Senescence
OLFM4	OLFactomMedin-4
PAF	Polypose Adénomateuse Familiale
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PEST motifs	Proline, glutamic acid, Serine, and Threonine motifs
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PLCs	Persistent LS174T Cells
PLD	Persistent LS174T Dividing cells
PLK1	Polo-Like Kinase 1
PLS	Persistent LS174T Senescent cells
PRC	Polycomb Repressing Complex
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PUMA	P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
Rb	protéine du Rétinoblastome
RNF43	ubiquitin E3 ligase RiNg Finger 43
ROCK	RhO-associated Coiled-coil forming Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SA-β-gal	Senescence Associated β-galactosidase
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SAHF	Senescence Associated Heterochromatin Foci
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
SFRP1	Secreted Frizzled-Related Protein 2
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SMAC/DIABLO	Second Mitochondria derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with LOw pl
SSC	Side SCatter
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVF	Sérum de Veai Foetal
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TGF-βR2	Transforming Growth Factor Beta
TNM	Tumour Nodes Metastasis
TOP1	TOPoisomérase de type I
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless-type MMTV integration site
Zeb	Zinc-finger enhancer binding

1. INTRODUCTION GENERALE

L'hétérogénéité génétique et phénotypique des cellules cancéreuses conduit à une hétérogénéité de la réponse à la chimiothérapie.

Au cours de l'oncogenèse et de la progression du cancer colorectal, les cellules échappent à de nombreuses voies de suppression tumorale. La première partie de cette introduction sera consacrée à la présentation des caractéristiques de ce cancer : de son origine à sa propagation en passant par l'hétérogénéité qui le définit. Comme d'autres, le carcinome colorectal résulte probablement de la sélection darwinienne d'altérations génétiques. La nature exacte de la cellule recevant la première altération est source de débat. Alors que, selon le modèle hiérarchique, les cellules souches étaient pressenties pour occuper cette place, la notion de plasticité cellulaire a bousculé nos idées préconçues. La transition épithélio-mésenchymateuse pourrait en effet être impliquée dans la dé-différenciation des cellules matures en cellules souches. Au sein de la tumeur, cette plasticité donne des perspectives au modèle stochastique, considéré jusque là comme démodé. Dans ce dernier modèle, toutes les cellules tumorales peuvent ré-initier une tumeur. Au niveau thérapeutique, ce modèle implique un ciblage global des différents types de cellules cancéreuses. En raison de l'hétérogénéité intra-tumorale, qui s'accroît au cours de la progression de la maladie, et du manque de ciblage des traitements actuels, les patients atteints de cancers métastatiques ont un très mauvais pronostic. Une meilleure compréhension de la relation entre l'hétérogénéité tumorale et la résistance à la chimiothérapie est indispensable pour identifier les cibles des futurs traitements.

La deuxième partie de cette introduction sera dédiée aux déterminants de la réponse à la chimiothérapie. L'irinotécan, un inhibiteur de l'ADN topoisomérase I utilisé dans le traitement des cancers colorectaux sera pris comme exemple. Les dommages de l'ADN, générés par des molécules génotoxiques comme l'irinotécan, induisent l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire. La nature des points de contrôle activés, leur durée d'activation ainsi que leur réversibilité modulent les mécanismes de mort cellulaire induits et l'échappement à ces mécanismes. Les processus d'apoptose et de sénescence, dépendant respectivement de la perméabilisation mitochondriale et de la voie p53-p21, seront détaillés. En raison de leur hétérogénéité, différents types de réponse pourraient être induits au sein d'une même tumeur et aboutir à la chimiorésistance. C'est le véritable problème des traitements actuels qui ne ciblent pas suffisamment les différentes populations intra-tumorales. L'hétérogénéité de réponse aux traitements et l'hétérogénéité cellulaire constituent un défi à relever pour les nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.1. Echappement aux voies de suppression tumorale : origine et progression métastatique du cancer colorectal.

1.1.1. Le cancer colorectal résulte d'une succession d'altérations génétiques et épigénétiques.

1.1.1.1. Généralités sur le cancer colorectal.

Le cancer colorectal (CCR) est un des cancers les plus répandus en France et dans le monde. Il est au troisième rang des cancers les plus fréquents, 10% de la totalité des cancers sont des cancers colorectaux (Jemal, Siegel, Xu, & Ward, 2010). D'après la base de données GLOBOCAN, 1,3 millions nouveaux cas ont été recensés dans le monde en 2012. Cette même année, il a été la cause de 700 000 décès. Le cancer colorectal touche majoritairement des personnes de plus de 50 ans avec un âge moyen d'apparition de 70 ans (Brenner, Kloor, & Pox, 2014).

En France, le dépistage de la maladie repose sur la recherche de sang dans les selles tous les deux ans chez les sujets âgés de 50 à 74 ans. En cas de positivité, une coloscopie est prescrite afin de rechercher la présence de lésions et, si c'est le cas, d'en extraire des biopsies. Les lésions recherchées sont des polypes. Un polype est une protubérance à la surface de l'épithélium visible à l'oeil nu. Ces lésions sont analysées par les anatomopathologistes qui déterminent le stade de la maladie. Alors que la majorité des polypes sont bénins, les polypes adénomateux sont susceptibles d'évoluer en carcinome colorectal. La transformation de l'adénome en carcinome dépend du degré de dysplasie, c'est-à-dire du degré d'altération du tissu.

Dans le cadre du CCR, la détermination du stade de I à IV dépend des critères TNM («Tumour Nodes Metastasis»). Cette classification se base sur le degré d'invasion des cellules cancéreuses au sein du tissu (T), le nombre de ganglions atteints (N) et la présence ou l'absence de métastases (M). Le stade au diagnostic permet d'évaluer le pronostic. Lorsque le cancer est localisé, la survie à 5 ans est de 90%, mais elle chute à 11% lorsqu'il est métastatique (Brenner et al., 2014). Le dépistage est donc une étape cruciale. Le stade permet aussi d'orienter les traitements. Pour les stades les plus bénins, le traitement principal est l'exérèse du segment concerné par chirurgie. Une radiothérapie et une chimiothérapie pré et/ou post-opératoire peuvent être réalisées de façon à faciliter l'opération et à diminuer le risque de récurrence.

1.1.1.2. Des formes sporadiques et héréditaires.

La majorité des tumeurs colorectales sont dites sporadiques, c'est-à-dire que la cause n'est pas liée à l'hérédité. Les facteurs de risque réunissent le tabagisme, la consommation d'alcool, de viande rouge, de charcuterie, de céréales raffinées, de sucre, la prise de poids et le manque d'activité physique (Chan & Giovannucci, 2010). La maladie survient donc de façon plus fréquente dans les pays développés. D'autres facteurs de risques sont décrits comme les maladies inflammatoires du tube digestif et l'infection par *Helicobacter pylori*. Dans d'autres cas, les patients ont des prédispositions génétiques qui se traduisent par des antécédents familiaux d'adénome ou de CCR. Ces altérations génétiques sont présentes dès la naissance de l'individu et sont transmises de génération en génération. Par exemple, la polypose adénomateuse familiale (PAF) se caractérise par une mutation constitutionnelle inactivant le gène suppresseur de tumeur APC (*Adenomatous polyposis coli*) sur une de ses deux copies. Toutes les personnes atteintes par cette maladie développent un CCR en moyenne à l'âge de 36 ans (Galiatsatos & Foulkes, 2006). L'étude de ces maladies héréditaires, prédisposant au CCR, a permis de mieux comprendre les mécanismes aboutissant à la formation d'un adénocarcinome au niveau de l'épithélium colorectal.

1.1.1.3. Gènes touchés par les altérations génétiques.

En 1990, la genèse du CCR a été décrite par Eric Fearon et Bert Vogelstein comme une succession d'altérations génétiques et chromosomiques touchant notamment les gènes APC (locus 5q), Ras et p53 (locus 17p) (Fearon & Vogelstein, 1990). Ils établissent un modèle de développement du cancer colorectal volontairement simplifié qui montre la succession de ces altérations dans un ordre précis. Ce modèle n'est en effet pas vraiment représentatif puisque seulement 6,6% de carcinomes colorectaux possèdent ces trois altérations réunies (G. Smith et al., 2002). La genèse du cancer colorectal est un processus complexe difficile à généraliser, de nombreuses combinaisons d'altérations génétiques sont retrouvées (Fearon, 2011). Ces altérations touchent de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire, ce qui rend probablement le modèle initial trop simpliste.

Altérations des gènes suppresseurs de tumeur dans le cancer colorectal

La plupart des gènes suppresseurs de tumeur participent aux points de contrôle du cycle cellulaire et régulent les signaux de stress et de mort. Dans les cancers, ils sont inactivés par mutation, perte de bras chromosomiques ou hyper-méthylation de leur promoteur. Les

gènes codant pour APC (*Adenomatous polyposis coli*) et p53 sont pris comme exemple dans ce paragraphe. La voie, connue pour être dérégulée précocement lors de la carcinogenèse colorectale, est la voie de la β -caténine. Cette protéine active la transcription de gènes codant notamment pour des protéines impliquées dans la prolifération comme par exemple c-Myc (Fearon & Dang, 1999). Cette voie est normalement inhibée via la dégradation de la β -caténine par le protéasome, via un complexe composé notamment d'APC. Ce complexe se lie à la β -caténine libre, la phosphoryle, induit son ubiquitinylation et enfin sa dégradation (Fodde, 2002). Dans la polypose adénomateuse familiale (PAF), le suppresseur de tumeur APC est inactivé par mutation. Alors que plus de 700 mutations différentes sont recensées pour ce gène, les plus courantes sont responsables de l'insertion d'un codon stop induisant la traduction d'une protéine tronquée inactive (Galiatsatos & Foulkes, 2006). La β -caténine n'est plus dégradée et active la prolifération de façon anormale. Des altérations d'APC sont aussi retrouvées dans 70 à 80% des cancers colorectaux sporadiques (Fearon, 2011). L'inactivation d'APC est donc un événement important dans la genèse du CCR, elle est considérée comme très précoce.

p53 est une autre protéine essentielle qui active notamment les mécanismes de mort cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Elle est mutée dans 40 à 50% des CCR (Iacopetta, 2003), au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. Ceci l'empêche d'activer entre autres la transcription de p21, un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire, de Puma et Noxa, des effecteurs de l'apoptose. Ces mutations pourraient aussi apporter de nouvelles fonctions oncogéniques à la protéine notamment en activant la transcription de nouveaux gènes cibles. Par exemple, dans la lignée colorectale SW480, sur-exprimant une forme mutante de p53, l'utilisation d'ARN interférent dirigé contre p53 diminue radicalement la clonogénicité et la tumorigenèse in vivo (Bossi et al., 2006). Dans cette lignée, un des gènes cibles de la forme mutante de p53, pouvant expliquer ce gain de fonction, est l'oncogène GRO1 (Growth-regulated oncogene 1) qui fait partie de la même famille que l'IL8 (Yan & Chen, 2009). Les mutants de p53 sont aussi impliqués dans le recyclage et le trafic intracellulaire de récepteurs comme MET et EGFR (P. A. J. Muller et al., 2009) (P. A. J. Muller et al., 2012). Ces nouvelles fonctions confèrent aux mutants de p53 un rôle oncogénique dans divers processus comme l'invasion, l'acquisition de capacités métastatiques ou la prolifération (P. A. J. Muller & Vousden, 2013). Elles restent à décrire dans la progression du cancer colorectal. Les altérations des gènes APC et p53, décrites dans le modèle de Vogelstein, sont donc importantes dans la genèse du cancer colorectal. D'autres altérations moins fréquentes sont également décrites comme celle de PTEN (Lièvre, Blons, & Laurent-Puig, 2010) (W. K. K. Wu et al., 2013).

Altérations des oncogènes dans le cancer colorectal

Les proto-oncogènes sont des gènes normaux qui, par mutation ou amplification, peuvent être exprimés de façon constitutive ou exprimer une protéine constitutivement active. Ils sont alors appelés oncogènes. Par exemple, la voie des MAP kinases est souvent activée de manière constitutive en raison de mutations sur des gènes de la famille de Ras, Raf ou sur les gènes codant pour des récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR qui interviennent en amont de cette voie. K-Ras appartient à la famille Ras qui code pour une protéine dont l'activité est dépendante d'un cycle d'échange GDP/GTP. Cette activation fait suite à la fixation de facteurs de croissance sur leurs récepteurs et entraîne la cascade des MAP kinases : MAPKK kinase (Raf), MAPK kinase (MEK) et MAP kinase (ERK). Lorsque la protéine ERK est activée, elle entraîne la transcription des gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Les mutations de Ras sont retrouvées dans 35 à 45% des CCR (Bos et al., 1987). Une des mutations fréquemment détectée est la substitution G12V. Cette mutation bloque la protéine sous sa forme active, Ras/GTP, en empêchant l'hydrolyse du GTP. Des mutations de Raf sont aussi recensées dans 5 à 10% des cancers colorectaux (Fearon, 2011). Dans les deux cas, les mutations aboutissent à l'activation constitutive de cette voie oncogénique et peuvent aussi activer d'autres voies comme PI3K/AKT et celle de la β -caténine (Cully, You, Levine, & Mak, 2006) (Phelps et al., 2009) (Mansi, Viel, Curtit, Medioni, & Le Tourneau, 2011) (A. Singh et al., 2012). La voie PI3K/AKT est une autre voie oncogénique activée par l'EGFR. Des altérations du gène PI3K seraient présentes dans 15% des tumeurs colorectales (Lièvre et al., 2010).

Dans les tumeurs, le taux de mutations aléatoires ne semble pas pouvoir expliquer l'apparition d'autant d'altérations génétiques ciblant des oncogènes et des suppresseurs de tumeur. Les mutations aléatoires, résultant d'erreurs lors de la réplication de l'ADN, sont des événements rares dans des cellules normales, de l'ordre de 10^{-7} . De plus, les systèmes de réparation corrigent la quasi-totalité de ces erreurs (A. L. Jackson & Loeb, 2001). Cela a amené l'hypothèse que l'instabilité génétique serait à l'origine de ces anomalies (Loeb, Bielas, Beckman, & Bodmer, 2008).

1.1.1.4. Différents types d'instabilité génétique dans le cancer colorectal.

Dans le CCR, deux types d'instabilités sont décrits. L'instabilité chromosomique, ou CIN, se caractérise par la perte de fragments ou de bras de chromosomes entraînant un phénotype aneuploïde. Elle peut entraîner la perte du gène suppresseur de tumeur APC (S. J. Baker et al., 1989) (Markowitz & Bertagnolli, 2009) (Fearon, 2011). L'autre type d'instabilité est l'instabilité génétique qui résulte de l'inactivation d'un des gènes du

système de réparation de l'ADN MMR («Mismatch Repair»). Dans ce cas, les mutations qui se produisent fréquemment au niveau de séquences répétées, telles que les séquences microsatellites, ne sont plus réparées (Markowitz & Bertagnolli, 2009). De nombreux gènes possèdent ces séquences répétées, notamment les gènes codant pour Bax, BMPR2, TGF- β R2, IGF1R, p16, PTEN (Söreide, Janssen, Söiland, Körner, & Baak, 2006). Ce phénotype, lié à l'inactivation du système de réparation, est appelé MSI («Microsatellite Instability»), il est caractéristique du syndrome HNPCC («Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer»). Les sujets touchés possèdent des mutations inactivatrices touchant majoritairement les gènes MSH2, MLH1 qui participent à la réparation MMR de l'ADN (Sancho, Batlle, & Clevers, 2004).

Cependant, le rôle de ces deux types d'instabilité dans l'apparition des premières lésions aboutissant la carcinogenèse colorectal n'est pas clairement établi. La fréquence de l'instabilité des microsatellites (MSI) est faible dans les cancers colorectaux sporadiques, ce qui exclu son rôle dans la genèse de ces derniers. Quant à l'instabilité chromosomique, les mutations inactivant le premier allèle d'APC précéderait cette instabilité (Fodde, 2002). En effet, c'est l'inactivation d'APC ou l'activation de la β -caténine qui participerait à l'instabilité chromosomique et non l'inverse (Fodde et al., 2001) (Aoki et al., 2006). APC interviendrait effectivement en mitose en favorisant le bon attachement des microtubules aux kinétochores. L'activation constitutive de la voie WNT participerait également à l'inactivation prématurée du complexe cycline B/CDK1 et donc à la sortie de mitose malgré des anomalies chromosomiques. Une altération précoce de la voie WNT conduirait donc à un défaut mitotique, entraînant une augmentation des anomalies chromosomiques.

1.1.1.5. Rôle de la sélection naturelle, darwinienne.

La pression de sélection d'un micro-environnement tumoral favorise l'émergence de cellules ayant des mutations bénéfiques pour la survie. Les cellules, pourvues de mutations activant la prolifération ou inactivant les voies de contrôle du cycle cellulaire, ont un avantage prolifératif vis-à-vis des autres cellules. Ces cellules prolifèrent plus que les autres et transmettent aux cellules filles ces mutations avantageuses, c'est la sélection darwinienne, ou naturelle. Les mécanismes de tumorigenèse peuvent s'expliquer par la sélection darwinienne (W. Bodmer & Loeb, 2008). Le CCR résulterait donc de la sélection d'une succession d'altérations favorisant la prolifération et la survie cellulaire comme le décrit le modèle de Eric Fearon et Bert Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990) (Figure 1). Cependant, ce modèle n'aborde pas une notion essentielle qui est la nature de la cellule à l'origine du cancer colorectal. Les cellules différenciées tapissant l'épithélium colorectal

ont une durée de vie courte. Soit l'activation d'un gène de survie permet à une de ces cellules différenciées de prolonger sa durée de vie, soit les mutations s'accumulent dans des cellules qui ont une durée de vie beaucoup plus longue, les cellules souches (Visvader, 2011). Ces cellules ayant une sensibilité différentes aux traitements génotoxiques, cette question est donc majeure dans la cadre de la chimiothérapie. Afin de bien introduire ces notions, je vais d'abord décrire l'organisation et le fonctionnement normal des cryptes colorectales.

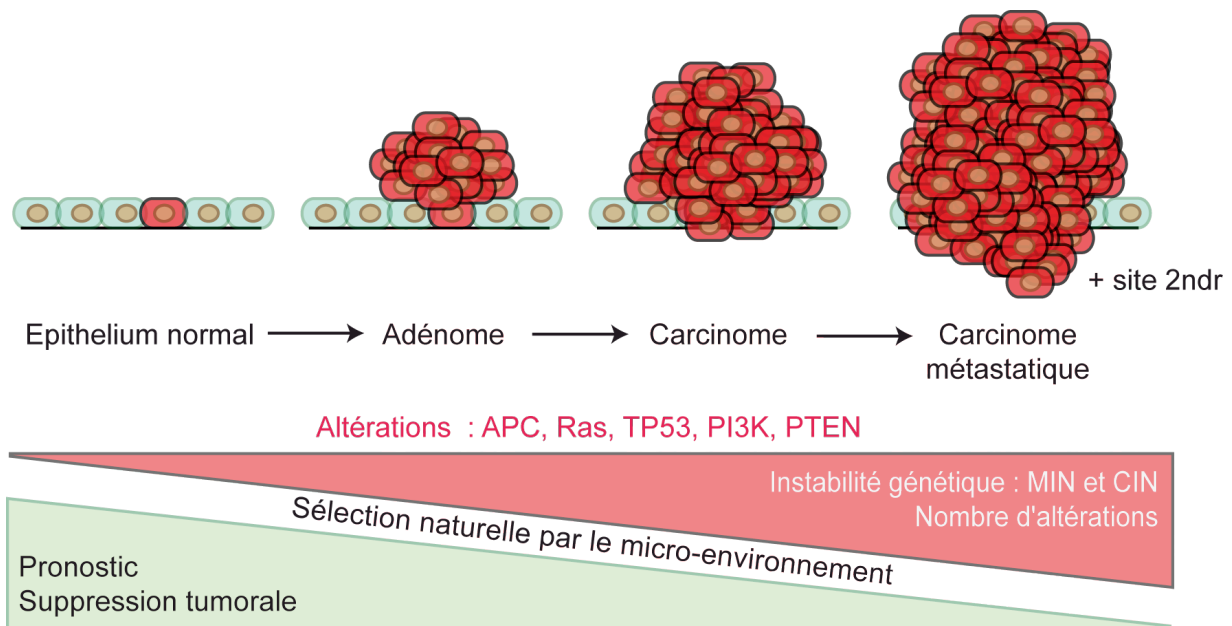


Figure 1 : Modèle de la carcinogenèse colorectale selon Vogelstein. Le carcinome colorectal résulte de la succession d'altérations génétiques inactivant des supresseurs de tumeurs comme APC et TP53 et activant des oncogènes comme Ras et PI3K. Au cours de la progression du cancer l'instabilité augmente ce qui génère de nouvelles altérations. L'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MIN) sont les deux types d'instabilité décrites dans le cancer colorectal. Toutes les altérations subissent une sélection darwinienne qui aboutit à l'accumulation d'altérations bénéfiques pour la survie, la croissance et la progression tumorale.

1.1.2. Origine tissulaire et cellulaire du cancer colorectal.

1.1.2.1. Organisation et fonctions normales du côlon et du rectum.

Au niveau anatomique.

Les cancers colorectaux désignent des tumeurs détectées dans le gros intestin, dernière partie du tube digestif, qui s'étend du cæcum au rectum. Il est subdivisé en trois parties : la partie proximale, comprenant le cæcum, le côlon ascendant et le côlon transverse; la partie distale, comprenant le côlon descendant et le côlon sigmoïde et, avant l'anus, le rectum faisant suite au côlon sigmoïde. Le passage des restes alimentaires dans le côlon permet leur déshydratation et l'absorption des vitamines et des sels restants.

Au niveau tissulaire.

Les intestins peuvent être assimilés à un tube. La paroi de ce tube est formée de quatre couches (Figure 2). En contact direct avec le *lumen*, la première est la muqueuse. Contrairement à l'intestin grêle, la muqueuse du gros intestin ne possède pas de villosités. Elle constitue donc une surface plane parsemée de cavités appelées cryptes de Lieberkühn (Sancho et al., 2004). La muqueuse se compose d'une simple couche de cellules épithéliales qui est séparée du tissu conjonctif de soutien (*lamina propria ou chorion*) par la membrane basale. Ce tissu conjonctif est qualifié de lâche, il est très vascularisé et abrite de nombreuses cellules immunitaires. Une fine pellicule de cellules musculaires, la muqueuse musculaire, complète la muqueuse. La sous-muqueuse, correspondant à un tissu conjonctif plus dense, est la deuxième couche. La troisième, la musculieuse, un ensemble de cellules musculaires lisses innervées, active les mouvements de l'organe lors du passage des aliments. Enfin la dernière est la séreuse, aussi appelé adventice, elle correspond à un tissu conjonctif posé sur un mésothélium.

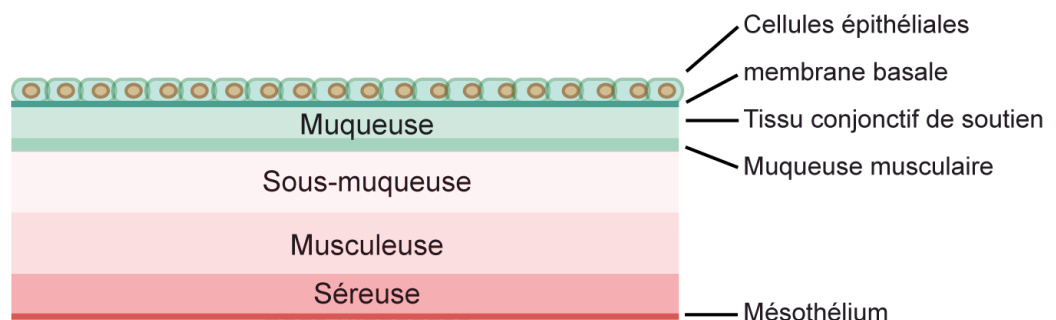


Figure 2 : Organisation tissulaire de la paroi intestinale. Cette paroi est constituée de quatre couches distinctes : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculieuse et la séreuse. La muqueuse est elle-même composée d'une couche de cellules épithéliales posée sur la membrane basale. Le tissu conjonctif de soutien et la muqueuse musculaire complète la muqueuse

Au niveau cellulaire.

Le long des cryptes de Lieberkühn, l'épithélium est composé d'une couche de cellules épithéliales comprenant des cellules différenciées, des progéniteurs et des cellules souches (Sancho et al., 2004) (Figure 3). Les cellules différenciées se localisent dans la partie supérieure de la crypte et sont de plusieurs types : les cellules absorbantes ou entérocytes et les cellules sécrétrices (Barker, 2013). Parmi ces dernières, les cellules calciformes sécrètent du mucus qui facilite le passage du contenu intestinal et protège la muqueuse. Elles sont présentes sous la forme d'un gradient le long de l'intestin. Peu présentes dans l'intestin grêle, elles sont majoritaires dans le gros intestin. De façon beaucoup plus rare, deux autres types de cellules sécrétrices sont retrouvés dans l'épithélium intestinal : les cellules entéro-endocrines et les cellules de Paneth. A l'instar de l'intestin grêle, ces dernières sont absentes dans le gros intestin. Cependant, des cellules sécrétrices, localisées à la base des cryptes colorectales sont présentes au contact des cellules souches. Ces cellules «Paneth like» pourraient constituer la contre-partie de cellules de Paneth dans le gros intestin (Rothenberg et al., 2012). Elles participent au maintien d'un environnement favorable et créent une niche pour les cellules souches en exprimant des ligands de Notch, comme DLL1 et 4, des ligands de la voie WNT, comme WNT3, et des facteurs de croissance comme l'EGF.

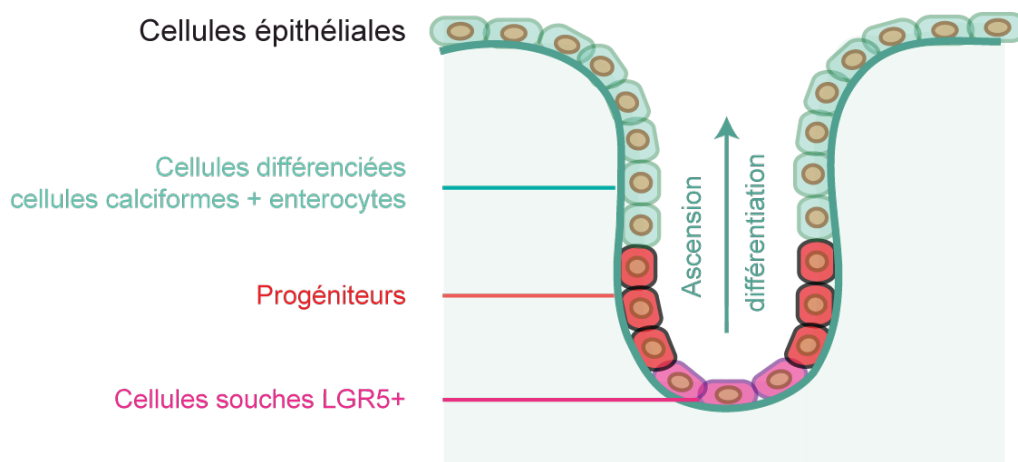


Figure 3 : Organisation cellulaire d'une crypte de Lieberkühn au sein de la muqueuse colorectale. Le renouvellement de la crypte dépend des cellules souches exprimant LGR5. Les cellules souches génèrent des progéniteurs qui ont une forte capacité proliférative. Ces cellules se différencient au cours de leur ascension à la surface de la crypte en cellules calciformes ou en entérocytes.

Le fort renouvellement de l'épithélium dépend en effet de quelques cellules souches qui tapissent le fond de ces cryptes (Radtke & Clevers, 2005). Deux groupes de cellules souches intestinales sont décrites (Barker, 2013). Elles se distinguent par un niveau de prolifération différent. Les cellules LGR5 positives (LGR5+) sont localisées à la base des

cryptes et se divisent rapidement. Elles expriment aussi les marqueurs ASCL2 et OLFM4 qui participent aux capacités souches et prolifératives (Jubb et al., 2006) (van der Flier et al., 2009) (Jang, Lee, & Kim, 2013) (Barker, 2013). A l'inverse, les cellules +4, localisées en position +4 par rapport au fond de la crypte, prolifèrent très peu et sont même considérées comme quiescentes par certaines équipes. Ces cellules expriment la protéine Bmi1 qui fait partie du complexe de répression transcriptionnelle PRC1 (polycomb-repressing complex 1). En reconnaissant des marques épigénétiques déposées par PRC2, ce complexe inhibe de façon stable l'expression de régions chromatiniennes où se situent des gènes de différenciation. Ces complexes maintiennent donc l'état souche des cellules +4 (Valk-Lingbeek, Bruggeman, & van Lohuizen, 2004) (Sangiorgi & Capecchi, 2008). Malgré leur faible nombre, ces dernières sont importantes pour l'homéostasie de la crypte car elles constituent une réserve de cellules souches (Vermeulen & Snippert, 2014). Une étude s'intéresse aux conséquences de la perte des cellules LGR5+. Une cassette contenant la séquence codant pour le récepteur de la toxine diphtérique est insérée au niveau du premier exon du gène codant pour LGR5 dans des souris. Le traitement des souris avec la toxine aboutit à la perte des cellules LGR5+ au fond des cryptes. Cette équipe a observé que malgré la perte de ces cellules, les cryptes fonctionnent normalement. En l'absence des cellules LGR5+, ce sont les cellules +4 qui assurent le renouvellement des cellules intestinales (H. Tian et al., 2012). Une autre étude montre que ces cellules +4 peuvent reconstituer le pool de cellules LGR5+ (Takeda et al., 2011). Ces deux types de cellules sont bien décrits dans l'épithélium de l'intestin grêle mais dans le gros intestin, la présence de cellules +4 n'est pas clairement établie (Barker, 2013). Il est en revanche bien admis que les cellules souches LGR5+ sont au sommet d'une pyramide hiérarchique dans l'épithélium intestinal. Une seule cellule LGR5+, obtenue après un tri cellulaire, est capable de former un organoïde in vitro (T. Sato et al., 2009). Cet organoïde reconstitue une structure très proche de celle de l'intestin avec un lumen entouré de cellules épithéliales qui forment plusieurs cryptes (T. Sato & Clevers, 2013). Une seule cellule LGR5+ reconstitue donc une crypte intestinale. Tout en maintenant leur nombre, les cellules LGR5 se divisent en progéniteurs («transit-amplifying cells» ou cellules TA). Ces derniers prolifèrent et se différencient au cours de leur ascension vers la surface de la crypte. Cette production continue de cellules épithéliales compense la perte de ces cellules à la surface de l'épithélium.

Les cryptes intestinales sont donc constituées de différents types de cellules que l'on peut diviser en deux groupes: les cellules différenciées et les cellules souches. Parmi ces dernières les cellules LGR5+ sont à l'origine de la formation des cryptes. Alors qu'elles sont à la tête de la hiérarchie de la crypte normale, ces cellules pourraient être au sommet

de la hiérarchie tumorale. Avant d'aborder cette notion, je vais présenter la régulation des processus de prolifération et de différenciation, essentiels au maintien de l'homéostasie des cryptes intestinales. Ces processus sont en effet sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation fréquemment dérégulées dans les cancers colorectaux. Ces dérégulations fréquentes suggèrent que l'homéostasie des cryptes est effectivement une cible importante dans la genèse du cancer colorectal. Il n'est d'ailleurs pas certain que les traitements actuels des cancers colorectaux soient capables de cibler ces différentes sous-populations.

1.1.2.2. Modulation de la prolifération des cellules cryptiques et de leur différenciation.

Le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal dépend donc de l'intégrité des cellules souches au fond des cryptes. L'organisation spatiale protège ces cellules souches en les plaçant à la base de la crypte. Les cellules plus différenciées, ayant une vie plus courte, se partagent la partie supérieure, plus exposée, de la crypte. L'homéostasie des cryptes de Lieberkühn est régulée par de nombreux signaux autocrines et paracrines impliquant majoritairement les voies WNT, Notch et BMP. Il est maintenant clair que ces signaux, régulant la hiérarchie cellulaire des cryptes, sont dé-régulés dans le cancer colorectal.

1.1.2.2.1. La voie WNT régule le fonctionnement des cellules souches LGR5+.

La voie WNT active la β -caténine.

Les protéines WNTs sont les ligands solubles des récepteurs transmembranaires Fzd («frizzled») et LRP5/6 («low density lipoprotein receptor related protein 5/6»). Cette voie contrôle la stabilité de la β -caténine et donc l'activation des facteurs de la famille LEF/TCF («lymphoid enhancer factor/T-cell factor») (Sancho et al., 2004) (Gregorieff, 2005) (Fodde & Brabletz, 2007) (Vermeulen et al., 2010) (Figure 4). L'interaction avec la β -caténine permet à ces derniers de passer de répresseur à activateur transcriptionnel grâce au recrutement d'histones acétylases et de co-activateurs. Parmi les gènes ainsi activés, il y a EphB2 et EphB3, deux récepteurs à activité tyrosine kinase permettant l'orientation des cellules le long de la crypte, cycline D, c-Myc, LGR5 et Ascl2 (Jubb et al., 2006). Ces protéines confèrent des caractéristiques souches et activent la prolifération. Lorsque le complexe APC, constitué d'APC, des deux kinases GSK3- β («Glycogen Synthase Kinase-3 β »), de la caseine kinase-1 (CK1) et d'une protéine de structure AXIN2, est actif, il phosphoryle la β -caténine. Cette phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine spécifiques adresse la protéine au protéasome. Le mécanisme exact expliquant

l'inactivation du complexe APC par les ligands WNTs est peu décrit. Lors de l'interaction WNT/récepteur, les protéines AXIN2 et GSK3- β seraient recrutées au niveau de ces récepteurs (Valvezan, Zhang, Diehl, & Klein, 2012). Ce recrutement déstabiliserait le complexe APC, conduisant à une diminution de l'activité de GSK3- β , au maintien de la β -caténine et à l'activation des gènes cibles LEF/TCF.

Activation de la voie WNT au fond des cryptes de Lieberkühn.

Dans les cellules souches LGR5+ et les cellules progénitrices, cette voie est responsable de la prolifération en activant la transcription des gènes codant pour c-Myc et cycline D. En revanche, la voie WNT est inactivée dans les cellules différenciées. Il existe donc un gradient d'activation de cette voie le long des cryptes de Lieberkühn. La voie WNT contrôle notamment l'expression du marqueur de cellules souches LGR5 (Barker, Tan, & Clevers, 2013). Ce dernier est un des récepteurs des R-spondins qui sont des facteurs de croissance amplifiant le signal WNT. L'interaction R-spondin/LGR5 inhibe les E3 ubiquitin ligases, dont RNF43, qui sont responsables de la dégradation des récepteurs Fzd (B.-K. Koo & Clevers, 2014) (Figure 4). L'expression de LGR5 et des R-spondin amplifie donc la voie WNT dans les cellules souches à la base des cryptes. Le facteur de croissance HGF, sécrété par les myofibroblastes présents dans l'environnement des cellules souches intestinales, est aussi associé à l'activation de la voie WNT (J. P. Medema & Vermeulen, 2011). Le mécanisme exact de cette association n'est pas clairement défini mais en se fixant sur le récepteur c-MET, HGF pourrait activer la voie PI3K/AKT (Lai, Abella, & Park, 2009) (Vermeulen et al., 2010). En inactivant GSK3- β , AKT participe à l'inactivation du complexe APC ce qui stabilise la β -caténine (Voskas, Ling, & Woodgett, 2014) (Maurer, Preiss, Brauns-Schubert, Schlicher, & Charvet, 2014) (Figure 4). Au fond des cryptes, l'ensemble de ces mécanismes favorise donc une forte activation de la voie WNT et en conséquence le bon fonctionnement des cellules souches LGR5+. Cette voie est donc essentielle à l'homéostasie des cryptes intestinales.

Dérégulation de la voie WNT dans le cancer colorectal.

Dans les cancers colorectaux, cette voie est dérégulée. Comme ce qui a déjà été dit, des mutations ou perte des allèles du gène APC sont fréquentes. Des mutations de la β -caténine, empêchant la phosphorylation par le complexe APC, sont aussi décrites. Des mutations activatrices de PI3K sont également recensées (Ogino et al., 2014). Elles peuvent induire une inhibition constante de GSK3- β et du complexe APC (Voskas et al., 2014) (Maurer et al., 2014). Des mutations de Ras entraînerait également l'activation complète de la voie WNT lorsque APC est inactivé (Phelps et al., 2009). L'activation excessive de cette voie pourrait maintenir un niveau de prolifération trop important dans

les cellules cryptiques et bloquerait la différenciation des cellules progénitrices. Ce défaut d'inactivation de la voie WNT pourrait aboutir à la formation lente de polypes. Cependant, au sein des tumeurs, l'activation de cette voie est hétérogène. En effet, des cellules différenciées sont présentes au sein des tumeurs ce qui montre qu'une certaine hiérarchie existe entre les cellules souches et les cellules différenciées (Prasetyanti et al., 2013). Les tumeurs colorectales pourraient donc être constituées à la fois de cellules souches cancéreuses (CSC), reposant sur une forte activité de la voie WNT, et de cellules différenciées n'exprimant pas cette signalisation. Cette hétérogénéité tumorale justifierait l'utilisation de traitements capables de tuer à la fois les cellules souches dépendant de la voie WNT et les cellules différenciées dépendant d'autres voies de signalisation.

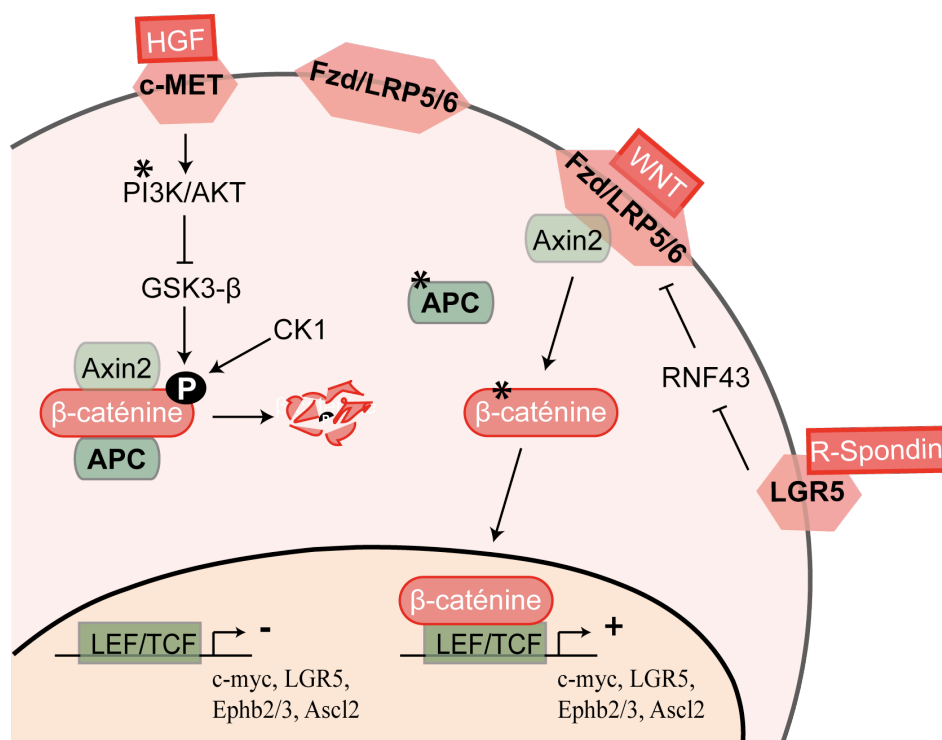


Figure 4 : La voie WNT est activée dans les cellules souches et dérégulée dans le cancer colorectal.

La voie WNT repose sur l'activation de la β -caténine. Cette dernière est inactivée par le complexe APC qui la sensibilise à la phosphorylation par GSK3- β et CK1. Lorsque WNT interagit avec ses récepteurs Fzd/LRP5/6, Axin2, un membre du complexe APC, est recruté au niveau de ces récepteurs. Le démantèlement du complexe APC active la β -caténine qui peut aller activer la transcription des gènes cibles de LEF/TCF : c-Myc, LGR5, Ephb2/3, Ascl2. Deux voies vont de le sens de l'activation de la β -caténine : la voie PI3K/AKT et la voie R-Spondin/LGR5. Quelques gènes codant pour les membres de cette signalisation sont retrouvés altérés dans le cancer colorectal (*).

1.1.2.2.2. La voie Notch à l'interface entre prolifération et différenciation le long des cryptes de Lieberkühn.

Activation du NICD.

Les récepteurs transmembranaires Notch (NOTCH 1, 2, 3 et 4) sont activés par des ligands eux-mêmes transmembranaires, les protéines DLL (Delta-like 1, 3 et 4) et JAG (Jagged 1 et 2) qui sont exprimées à la surface des cellules voisines (Figure 5). L'interaction récepteur-ligand induit plusieurs clivages du récepteur. Parmi ces clivages, le dernier est réalisé par la protéase γ -sécrétase qui libère le NICD («Notch intracellular domain») (Sancho et al., 2004) (Radtke & Clevers, 2005) (Reedijk et al., 2008) (Kazanjan & Shroyer, 2011) (Pellegrinet et al., 2011). Dans le noyau, NICD interagit avec les facteurs répresseurs transcriptionnels CSL (CBF1/RBPjk). Ces facteurs deviennent alors activateurs de la transcription des gènes codant pour les protéines de la famille bHLH («basic helix-loop-helix») (Figure 5). Parmi ces gènes, HES («hairy-enhancer of split») régule la prolifération et la différenciation des cellules intestinales.

La voie Notch contrôle la prolifération et la différenciation des cellules cryptiques.

Dans les cellules souches LGR5+ et les progéniteurs, la voie Notch participe à la prolifération et au maintien du caractère souche (Figure 5). Transcriptionnellement activé par NICD, Hes 1 est un inhibiteur transcriptionnel des protéines p27Kip1 and p57Kip2, qui sont des inhibiteurs des CDK (Cyclin-Dependent Kinase). Chez la souris, la perte de NOTCH1 et NOTCH2 induit la perte de Hes 1 et conduit donc à une différenciation complète des cellules cryptiques via l'expression de p27Kip1 and p57Kip2 (Riccio et al., 2008). La voie Notch permettrait donc de limiter la différenciation et de maintenir la prolifération au sein de la crypte (Fre et al., 2005). Mais cette voie participe aussi à la différenciation des cellules intestinales via la régulation de l'expression de ATOH1 (HATH1/MATH1) qui est crucial pour l'engagement des cellules en lignée sécrétrices, calciformes (Q. Yang, Bermingham, Finegold, & Zoghbi, 2001). Lorsque la voie Notch est active, Hes1 réprime la transcription de ATOH1, les cellules se dirigent alors vers un phénotype entérocytaire. En revanche, lorsque cette voie est inactive, les cellules se différencient en cellules calciformes via l'expression de ATOH1 (Fre et al., 2009).

Dérégulation de la voie Notch dans le cancer colorectal.

En parallèle d'une voie WNT anormale, les cellules cancéreuses sont également régulées par la voie Notch. En effet, l'inhibition de Notch par le DBZ (dibenzazepine) induit une différenciation des lignées d'adénocarcinomes en cellules calciformes (Prasetyanti et al., 2013). La même observation est faite suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la γ -sécrétase,

qui bloque la libération du NICD (van Es et al., 2005). Au sein des tumeurs du colon, la majorité des membres de la voie Notch sont exprimés à des niveaux au moins identiques à ce qui est observé au niveau de la base des cryptes (Reedijk et al., 2008). NOTCH 1 est même sur-exprimé dans les cancers colorectaux (Y. Zhang, Li, Ji, & Zheng, 2010). Dans ces cancers, une preuve de l'activité de Notch est que les cellules calciformes sont absentes et que l'expression de ATOH1 est très faible (LEOW, Romero, Ross, POLAKIS, & GAO, 2004) (LEOW, POLAKIS, & GAO, 2005). De plus, l'activation de Notch dans des souris APC^{+/mut} conduit à l'apparition d'un grand nombre d'adénomes colorectaux (Fre et al., 2009). Dans une autre étude intéressante, les auteurs ont injecté chez la souris des cellules HCT15, transfectées de façon stable avec un shRNA dirigé contre Jagged 1. Les cellules possédant le shRNA contrôle forment des tumeurs de taille dix fois plus importante que les cellules ayant le shRNA Jagged1 (Y. Dai et al., 2014). En plus de la voie WNT, ces résultats montrent que la voie Notch participe au pouvoir tumorigénique des cellules cancéreuses colorectales. Il est donc probable que l'hétérogénéité tumorale repose au moins sur ces deux voies de signalisation, compliquant de fait l'identification des cellules à l'origine de la tumeur et des cellules à éliminer lors du traitement.

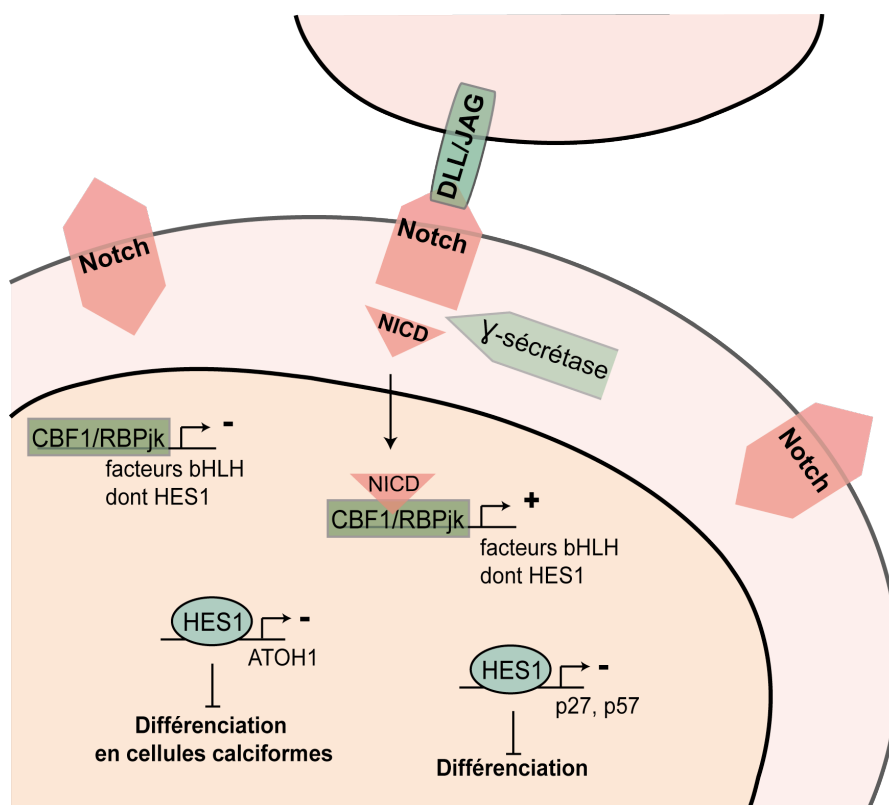


Figure 5 : La voie Notch inhibe la différenciation et particulièrement la génération de cellules à mucus (cellules calciformes). L'interaction entre Notch et les ligands transmembranaires DLL et JAG active le clivage de Notch par la γ-sécrétase. Le NICD («Notch IntraCellular Domain») libéré active la transcription de HES1. Ce dernier est un répresseur transcriptionnel de p27 et p57, des inhibiteurs des CDK, et de ATOH1 essentiel à la différenciation en cellules calciformes.

1.1.2.2.3. La voie BMP régule la différenciation des cellules cryptiques.

La voie BMP peut-être dépendante et indépendante des SMADs.

Les protéines BMP («Bone morphogenetic protein») appartiennent à la famille du TGF- β (Massagué, 2012). Les ligands BMP se fixent sur leurs récepteurs BMPR1 et BMPR2. Cet hétéroduplex forme le récepteur entier et possède une activité sérine/thréonine kinase, il peut ainsi s'auto-phosphoryler. Ainsi activé, il phosphoryle les R-SMAD (receptor-Smads : SMAD 1, 5 et 8). Cette dernière phosphorylation permet l'association des R-SMAD avec SMAD4, complexe qui exerce l'activité de facteur de transcription. Dans d'autres cas, une voie non canonique, indépendante de SMAD, est activée par les BMP comme les kinases p38, JNK ou ROCK. Des antagonistes des BMP, inhibiteurs de cette signalisation, sont aussi décrits tels que Noggin, Follistatin et Gremlin (C. Tian & Liu, 2013) (Figure 6).

La voie BMP/SMAD4 contrôle la différenciation dans la partie supérieure des cryptes.

Les cellules cibles, dans lesquelles cette voie est active, sont localisées dans la partie supérieure des cryptes, ce sont les cellules différenciées (Hardwick et al., 2004). L'interaction BMP/BMPR conduit en effet à l'arrêt de la prolifération et à la différenciation (J. P. Medema & Vermeulen, 2011). Cette voie serait importante particulièrement pour la différenciation en cellules sécrétrices (Auclair, Benoit, Rivard, Mishina, & Perreault, 2007). Les BMP sont exprimés tout au long de la crypte et la modulation de cette voie dépend de l'expression de ses antagonistes. Dans la partie inférieure de la crypte, Noggin, un antagoniste des BMP, est sécrété par les myofibroblastes (J. P. Medema & Vermeulen, 2011). L'inhibition de la voie BMP conserve le caractère souche des cellules à la base des cryptes et maintient la prolifération des progéniteurs. Dans les cellules souches, la voie WNT ne serait donc pas suffisante pour maintenir les caractéristiques de ces cellules. L'inhibition des BMP, par Noggin, serait en effet essentielle pour induire une activation suffisante de la β -caténine (He et al., 2004). La voie BMP, en bloquant la voie PI3K/AKT, inhibe en effet l'activation de la β -caténine. La présence de Noggin permettrait donc une activation optimale de la β -caténine au fond des cryptes et serait par conséquent essentielle à la viabilité des cellules souches.

Perte de SMAD4 dans le cancer colorectal : inactivation de la voie BMP ou gain de fonction.

Dans les cancers colorectaux, la voie BMP est souvent inactivée, et ceci de façon très similaire à celle du TGF- β . Des mutations du gène codant pour le récepteur de type 2 sont recensées dans les cancers de phénotype MSI, qui représentent 12 à 15% des cas (Laurent-Puig, Agostini, & Maley, 2010). Aussi, SMAD4 peut être inactivé par mutations ou perte de portions chromosomiques dans les cancers de phénotype CIN (Laurent-Puig et

al., 2010). Dans certains cancers colorectaux héréditaires, GREM1 (Gremlin), un antagoniste des BMP, est sur-exprimé par duplication de séquences promotrices (Jaeger et al., 2012). L'inactivation de la voie BMP conduit à l'augmentation du nombre de cellules souches et de cellules progénitrices. Elle serait importante pour la progression du stade d'adénome au carcinome colorectal (Kodach et al., 2008).

A l'inverse, cette voie de suppression tumorale pourrait jouer alors un rôle positif dans la progression de la maladie à des stades plus tardifs. Ce revirement a été très étudié dans le cas du TGF- β . La perte de SMAD4, le médiateur intra-cellulaire essentiel de la voie, pourrait être un élément important (B. Zhang et al., 2009). Une étude intéressante montre que l'effet de la sur-expression de BMPR dépend du statut de SMAD4. Suite à l'inhibition de l'expression de SMAD4, la sur-expression de BMPR2 induit l'augmentation des capacités de migration, d'invasion, et le processus d'EMT. Ce qui n'est pas observé dans des cellules exprimant SMAD4 (Voorneveld et al., 2014). De façon indépendante de SMAD4, la voie BMP active alors d'autres voies de signalisation comme celle de Rho/ROCK/LIMK qui est impliquée dans la migration cellulaire (Voorneveld et al., 2014). Au stade précoce, lorsque SMAD4 est fonctionnel, les BMP sont impliqués dans la différenciation cellulaire et le blocage de la prolifération. Ils ont donc un rôle de suppression tumorale. Cette fonction se retrouve inversée à des stades plus tardifs, lorsque SMAD4 est inactivé (Figure 6). Dans cette dernière condition, les BMP activent des voies de signalisation non canoniques impliquées dans la migration et l'invasion. Au stade tardif, ils participent donc à la progression et à l'agressivité des cancers colorectaux.

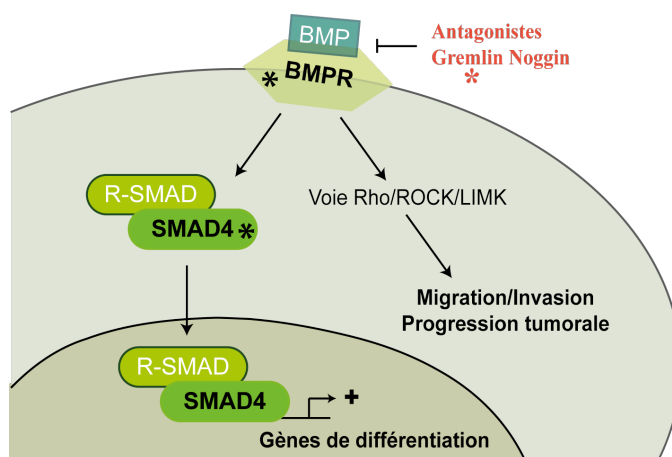


Figure 6 : La voie BMP a deux visages. Lorsque la voie SMAD4 est fonctionnelle, la fixation des BMP sur leurs récepteurs active l'interaction R-SMAD/SMAD4 qui active la transcription de gènes impliqués dans la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire. L'expression de Gremlin et Noggin, des antagonistes des BMP, bloque cette signalisation. Lorsque la voie SMAD4 n'est pas fonctionnelle, c'est la voie Rho/ROCK/LIMK qui est activée, elle régule la migration et l'invasion. Quelques gènes codant pour les membres de cette signalisation sont retrouvés altérés dans le cancer colorectal (*).

En plus des voies WNT et Notch, l'inactivation de la voie canonique des BMP dérègle l'équilibre entre cellules souches et cellules différenciées au sein de la crypte ce qui participe directement à la genèse et à l'hétérogénéité du cancer colorectal.

1.1.2.2.4. Les signalisations WNT, Notch et BMP définissent la structure de la crypte et l'équilibre entre cellules souches et cellules matures.

Les voies de signalisation WNT, Notch et BMP, modulent la prolifération et la différenciation. Elles définissent donc l'organisation des différentes cellules au sein des cryptes normales (T. Sato & Clevers, 2013) (Stange & Clevers, 2013) (Krausova & Korinek, 2014). Les acteurs de cette structuration sont les cellules épithéliales, différenciées et non différenciées, et les cellules stromales (Figure 7). Les cellules peuvent interagir directement par contact entre deux protéines transmembranaires ou via l'expression de protéines solubles. Dans la partie inférieure de la crypte, les cellules «paneth like» expriment les ligands transmembranaires de Notch, les protéines DLL, et les ligands solubles WNT et EGF. Les cellules stromales constituent une autre source de ligands WNT, EGF et HGF. Elles sécrètent aussi des antagonistes de la voie BMP comme Noggin et Gremlin (Kosinski et al., 2007) (Figure 7). L'ensemble de ces signaux permet l'activation des voies WNT et Notch et l'inhibition de la voie BMP dans les cellules LGR5+. Cela maintient leurs caractéristiques souches. Dans la partie supérieure de la crypte, les cellules «paneth like» sont absentes. De plus, les myofibroblastes sont moins nombreux qu'à la base de la crypte comme le montrent des immuno-marquages de α -SMA («alpha-smooth muscle actin») sur des cryptes intestinales (Powell et al., 1999) (Madison et al., 2005). Les ligands WNT, EGF, HGF ainsi que Noggin et Gremlin sont donc en concentration beaucoup plus faible. La voie WNT est alors moins active. N'étant plus inhibée, la voie BMP dirige la différenciation des cellules localisées dans cette partie de la crypte. Notch y participe également.

La dérégulation des voies de signalisation WNT, Notch et BMP participe donc à la genèse du cancer colorectal en perturbant l'homéostasie des cryptes et la relation entre cellules différenciées et non différenciées, notion que n'abordait pas le modèle de Vogelstein. La voie WNT (altérations des gènes APC, β -caténine, PI3K) est retrouvée activée dans la plupart des cancers et celle des BMP (altérations des gènes SMAD4, BMPR2) est parfois inhibée. Ces altérations conditionnent la balance entre cellules souches et cellules différenciées, et donc le niveau d'hétérogénéité tumorale. Les traitements doivent tenir compte de cette hétérogénéité et doivent cibler les différentes populations tumorales. Cependant si les cellules souches sont à l'origine du cancer colorectal et maintiennent la

croissance tumorale, le ciblage de ces cellules par les traitements serait théoriquement suffisant. Deux modèles s'affrontent, le modèle stochastique et le modèle hiérarchique.

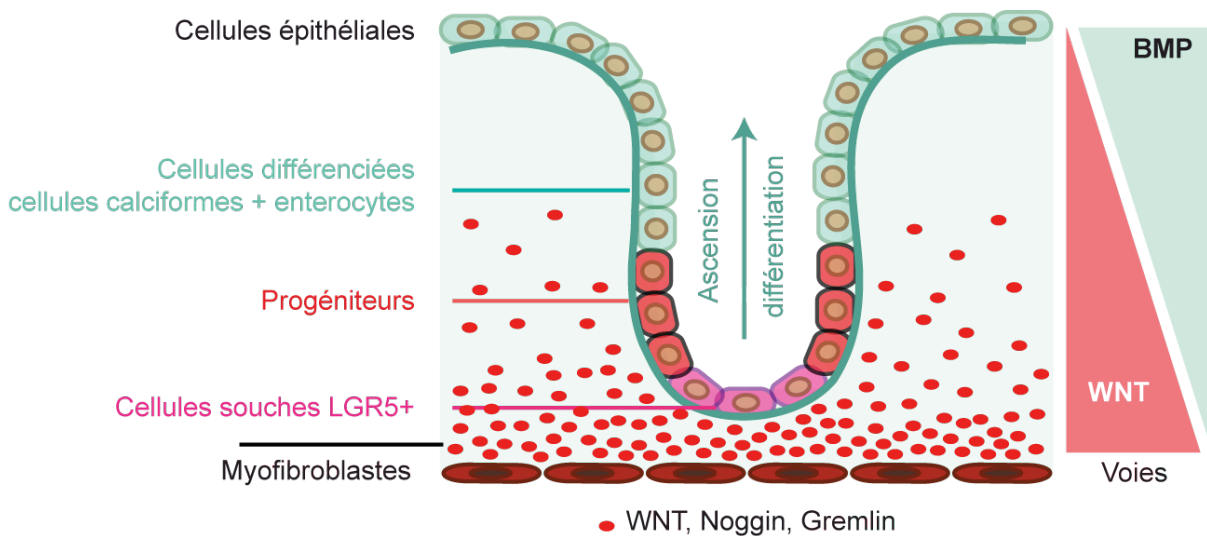


Figure 7 : Différentes signalisations définissent l'organisation cellulaire de la crypte. Parmi elles, la voie WNT et BMP ont une place importante. A la base de la crypte, les myofibroblastes sécrètent les ligands WNT et des antagonistes des BMP. Ces cellules créent une niche favorable pour les cellules souches avec l'activation de la voie WNT mais pas celle des BMP. Dans la partie supérieure de la crypte la voie BMP n'est plus inhibée et dirige la différenciation.

1.1.2.3. Les cellules souches à l'origine du cancer colorectal?

1.1.2.3.1. Le modèle stochastique et le modèle hiérarchique.

Le concept de cellule souche cancéreuse, aussi appelée cellule initiatrice de cancer, a été amené la première fois dans les années 1960. L'idée était de savoir si toutes les cellules cancéreuses ont la capacité de ré-initier une tumeur ou si seulement certaines d'entre elles en sont capables. Dans les deux cas, les modèles prennent en compte l'hétérogénéité cellulaire tumorale observée dans les cancers liquides et solides. Le modèle stochastique stipule que la tumeur est biologiquement homogène et que l'hétérogénéité cellulaire est modulable et aléatoire, due à des facteurs dépendants de signaux internes ou externes. En revanche, le modèle hiérarchique stipule que les cellules tumorales fonctionnent de la même façon que les cellules dans leur tissu d'origine. La hiérarchie est maintenue par des cellules souches qui sont biologiquement différentes des cellules matures. Ces cellules sont capables de restaurer la totalité de la tumeur grâce à leurs capacités d'auto-renouvellement et de multipotence. A l'inverse du modèle stochastique, dans ce dernier modèle, la cellule à l'origine du cancer est nécessairement

une cellule souche. Alors que le modèle stochastique implique un ciblage thérapeutique large des cellules cancéreuses, le modèle hiérarchique identifie les cellules souches cancéreuses comme les cellules à cibler (Figure 8).

1.1.2.3.2. Origine du concept de cellules souches cancéreuses dans les leucémies.

C'est dans les leucémies que les premières évidences de l'existence de populations de cellules souches cancéreuses ont été apportées (J. C. Y. Wang & Dick, 2005). A la tête du système hiérarchique, des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes sont à l'origine de toutes les cellules sanguines. Dans les leucémies, l'ensemble de ces cellules peuvent posséder les altérations génétiques ce qui signifie que ces altérations ont pu avoir lieu dans des cellules souches responsables de la production des différents types de cellules différenciées. Dans des expériences menées notamment par l'équipe de John Dick sur des leucémies myéloïdes aiguës (AML), seules de rares cellules sont capables d'initier et de maintenir la croissance d'un clone leucémique *in vivo*. Ces cellules n'exprimant pas CD38, expriment CD34 mais elles n'expriment pas les autres marqueurs des cellules souches hématopoïétiques normales, CD90 et CD117. Ces cellules CD34+ sont identifiées comme les cellules souches leucémiques. Ces expériences ont remis en cause le modèle stochastique. Comme leur version normale, les cellules souches leucémiques sont quiescentes et donc difficiles à atteindre par les chimiothérapies. Elles sont capables de produire plusieurs types de cellules différenciées. En aval des cellules souches cancéreuses qui reçoivent la première anomalie, les progéniteurs auraient une capacité de prolifération augmentée et seraient responsables de la dérégulation de la production des cellules sanguines. Dans ce cas, la cellule subissant la première anomalie n'est pas celle qui prolifère le plus mais celle qui prolifère le moins. Ces cellules constituent donc un réservoir de cellules cancéreuses quiescentes. Ce modèle remet en cause le principe des traitements génotoxiques, qui touchent pour la plupart les cellules proliférantes et donc qui épargnent les cellules souches cancéreuses quiescentes. De nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les cellules souches cancéreuses sont apparues pour répondre à ce modèle hiérarchique (Figure 8).

1.1.2.3.3. Adaptation au tumeur solide, l'exemple du cancer colorectal.

Le modèle hiérarchique dans la genèse du cancer colorectal.

Théoriquement possible, l'accumulation de mutations sur la durée est difficile à envisager dans les cellules différenciées de la crypte intestinale, comme dans les autres systèmes épithéliaux. En effet, ces cellules ne se divisent pas et ont une durée de vie courte. Il est donc peu probable que ces cellules soient à l'origine du cancer colorectal. En revanche, les cellules souches possèdent une durée de vie plus longue et maintiennent leur nombre grâce à leur capacité d'auto-renouvellement. Elles sont donc plus aptes à être les cellules dans lesquelles s'accumulent les mutations (Visvader, 2011). C'est de cette logique, initiée par John Dick, que s'est imposé le concept des cellules souches cancéreuses dans le cancer colorectal. Dans le colon, les cellules souches normales sont les cellules LGR5+ qui, contrairement aux cellules souches hématopoïétiques, se divisent rapidement, sous le contrôle de la voie WNT (Snippert, Schepers, van Es, Simons, & Clevers, 2013) (Schuijers & Clevers, 2012). Elles sont à l'origine de la formation des différentes cellules épithéliales composant les cryptes intestinales. Chaque crypte est clonale, c'est à dire qu'une seule cellule en est à l'origine et maintient son renouvellement. Une étude intéressante a montré que l'altération d'APC, considérée comme la première altération à l'origine du cancer colorectal, a des conséquences différentes suivant la cellule dans laquelle elle intervient. En effet lorsque la perte d'APC, par recombinaison Cre-loxp, est induite dans des progéniteurs de la crypte, l'efficacité de transformation c'est à dire l'efficacité de la formation de micro-adénomes est faible. En revanche lorsque l'altération est induite dans les cellules souches LGR5+, des microadénomes sont visibles au bout de quelques semaines. Ils contiennent une petite proportion de cellules LGR5+, ce qui montre que la hiérarchie cellules différenciées et non différenciées est toujours maintenue dans ces lésions précoces (Barker et al., 2009) (Vermeulen et al., 2008). Les expériences suggèrent donc que les cellules LGR5+ seraient les premières cellules touchées par les anomalies oncogéniques sous l'influence de la β -caténine. Toutes les cellules composant l'adénome expriment également l'oncogène c-Myc (Barker et al., 2009). Les progéniteurs issus de la cellule souche mutée vont donc avoir un avantage prolifératif et vont prendre la place des cellules différenciées jusqu'à composer la totalité de la crypte. Ces progéniteurs continueront tout de même à générer les différents types de cellules différenciées qui auront la première altération, la perte d'APC. Cela correspond à la conversion monoclonale de la crypte. L'altération peut s'étendre à de plus grande partie de l'épithélium par fission cryptique jusqu'à la formation d'un adénome, c'est l'expansion clonale.

Ces études sur l'apparition de lésions précoces sont en accord avec le modèle hiérarchique. Cependant, la caractérisation des différents mécanismes aboutissant à la formation d'un cancer est plus complexe. En effet, même si les premières altérations génétiques touchent probablement une cellule souche, les altérations tardives indispensables au processus de cancérogenèse peuvent aussi se produire dans les progéniteurs et les cellules différenciées dérivant de la cellule souche initialement touchée. A l'heure actuelle, aucune étude ne permet d'exclure cette possibilité. Malgré sa large utilisation, le terme de cellules souches cancéreuses (CSC), pour définir les cellules tumorales capables de ré-initier une tumeur, n'est donc pas adapté à toutes les situations (Zeki, Graham, & Wright, 2011). Le terme de cellules initiatrices de cancer (CIC) est plus légitime car il traduit une capacité qui peut être vérifiée expérimentalement en conditions de xénogreffe et qui n'est pas nécessairement associée à une cellule souche. Cependant, de nombreuses études utilisent ce terme de CSC, il est donc difficile de l'ignorer.

En caractérisant la cellule dans laquelle se produit la première altération à l'origine du cancer colorectal, ces études complètent les travaux de Bert Vogelstein. La première altération, touchant le gène APC et activant la voie WNT, semble donc avoir lieu dans une cellule souche normale de la crypte colorectale. D'autres altérations se succèdent mais les cellules dans lesquelles elles interviennent restent encore à déterminer. Dans le cancer colorectal, l'intérêt du ciblage des cellules souches dépend de la nature souche ou non des cellules cancéreuses composant le carcinome à un temps donné.

Identification difficile des marqueurs de cellules souches cancéreuses dans le CCR.

Les marqueurs extra-cellulaires les plus utilisés pour caractériser les cellules souches cancéreuses colorectales humaines sont CD133, CD44, CD166, CD24, CD29, EpCAM, LGR5 et ALDH. Le pourcentage de cellules exprimant tels ou tels marqueurs est très variable d'une étude à une autre, d'un prélèvement à un autre et d'une lignée cellulaire à une autre. Par exemple CD133 est exprimé par les cellules HT29 et pas chez les cellules LS174T (A. B. Mak et al., 2012) (Kreso et al., 2013). Malgré de très nombreuses études ces marqueurs ne sont toujours pas clairement établis. Le test de CIC est l'injection de sous populations triées chez des souris immuno-déficientes. Une première contrainte est de disposer de bons anticorps dirigés contre une cible extra-cellulaire pour le tri cellulaire. D'autre part, les modèles animaux NOD/SCID ne sont pas complètement dépourvus de système immunitaire (Quintana et al., 2008). L'immunité résiduelle aurait amené à sous-estimer le pourcentage de cellules cancéreuses capables d'initier une tumeur in vivo. Aussi, les cellules cancéreuses transplantées ne reçoivent pas les signaux sécrétés par l'environnement de l'organe source. Dans le cas du mélanome, une étude a estimé le

nombre de cellules capables d'initier une tumeur chez l'animal (Quintana et al., 2008). Ce pourcentage est de 27% lorsque les cellules sont injectées avec du matrigel dans de nouveaux modèles animaux NOD/SCID Il2rg^{-/-} dépourvus de cellules NK. Dans des modèles NOD/SCID classiques et sans matrigel ce pourcentage est inférieur à 0,001%. Pourtant, le modèle des cellules souches cancéreuses s'appuie sur un faible nombre de cellules initiatrices qui maintiennent la hiérarchie tumorale. Les résultats de l'étude de Quintana vont à l'encontre de ce modèle car un quart des cellules tumorales seraient alors des CSC. Dans le cancer colorectal comme dans de nombreux cancers épithéliaux, les preuves définitives de ce modèle hiérarchique manquent donc. Une partie de ces cancers ne suivrait donc pas le modèle hiérarchique.

1.1.2.3.4. La plasticité cellulaire et l'influence du micro-environnement : Vers un retour au modèle stochastique?

Rôle du micro-environnement dans les capacités d'initiation tumorale.

Dans une étude élégante, l'équipe de Louis Vermeulen apporte une explication à ces disparités. Il montre que les cellules souches cancéreuses du colon sont les cellules localisées au niveau du front invasif, ayant une forte activité WNT (Vermeulen et al., 2010). Dans cette étude, les cellules issues de cancers colorectaux humains sont transfectées avec un vecteur TOP-GFP, puis triées en fonction de l'intensité de fluorescence du GFP. Les cellules GFP^{high}, ayant une activité WNT élevée, sont celles qui expriment les marqueurs CD44, CD24 et CD133. De plus, elles ont la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez la souris ce qui n'est pas le cas des cellules GFP^{low}. Mais le plus intéressant est que ces caractéristiques souches dépendent de facteurs sécrétés par les myofibroblastes présents sur le front tumoral (Vermeulen et al., 2010). Les cellules GFP^{low}, ayant une faible activité de WNT, acquièrent finalement ces capacités d'initiation tumorale lorsqu'elles sont injectées avec du milieu conditionné de myofibroblastes, purifiés à partir de cancers colorectaux humains. Cette étude témoigne de l'influence de l'environnement sur les caractéristiques initiatrices des cellules tumorales. La majorité des tests de xénogreffes sont réalisés sans ces conditions micro-environnementales. Il est donc probable que ces études sous-estiment la capacité des cellules tumorales à reformer une tumeur in vivo et donc sous-estiment leurs rôles dans la rechute tumorale. Dans l'étude de Vermeulen *et al*, cité précédemment, c'est HGF qui permettrait à ces cellules WNT^{low} d'acquérir des capacités d'initiation tumorale (Vermeulen et al., 2010). La présence de CIC et l'hétérogénéité tumorale peuvent donc être modulées par des signaux provenant du stroma. D'autres études récentes confirment l'importance des facteurs du stroma dans les capacités d'initiation tumorale. Par exemple dans des

lignées de cancer du sein, l'initiation tumorale en xénogreffe est fortement diminuée lorsque les cellules sont injectées avec BMP4 et SFRP1, un antagoniste des ligands WNT (Scheel et al., 2011). Si l'ensemble de ces résultats sont confirmés, l'intérêt de cibler les cellules souches cancéreuses dans les traitements de chimiothérapie serait donc amoindri. En effet, la perte de ces cellules pourrait être compensée par des mécanismes de dédifférenciation issus du micro-environnement. Ce dernier devrait alors devenir une cible privilégiée des chimiothérapies (Figure 8).

La transition épithélio-mésenchymateuse est impliquée dans la tumorigenèse.

Ces résultats font écho au processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui a fait l'objet d'un grand intérêt ces dernières années. Ce processus de dé-différenciation permet à une cellule épithéliale d'acquérir les caractéristiques d'une cellule mésenchymateuse sous l'influence de facteurs extra-cellulaires comme HGF ou TGF- β par exemple. Via l'induction de l'expression des facteurs de transcription Twist et Snail, l'EMT est associée à l'acquisition de marqueurs de cellules souches dans des cellules mammaires (Mani et al., 2008). En effet, l'EMT induit la conversion des cellules CD44^{low}/CD24^{high} en cellules CD44^{high}/CD24^{low} et l'augmentation de la capacité à former des mammosphères. Ce processus de dédifférenciation générant des cellules de type CIC serait d'autre part impliqué dans l'inactivation des mécanismes de suppression tumorale. Dans les neuroblastomes, Twist inhiberait la mort cellulaire induite par la sur-expression de l'oncogène Myc en diminuant l'activation de la voie ARF/p53 (Valsesia-Wittmann et al., 2004). Dans une autre étude, l'expression transcriptionnelle de Twist1 et Twist2 a été mesurée dans des prélèvements tumoraux humains de cancers du colon, du sein, de la peau, des poumons, des reins et dans des leucémies en comparaison avec leurs tissus sains (Ansieau et al., 2008). Pour exemples, Twist1 ou Twist2 sont sur-exprimés dans 100% des mélanomes, 78% des cancers du colon et 52% des cancers du sein. Cette étude montre que ces facteurs de transcription favorisent la transformation cellulaire induite par l'oncogène Ras (Ansieau et al., 2008). En bloquant l'expression de p21 et p16 et donc la sénescence induite par l'activation de l'oncogène Ras (OIS ou «Oncogene Induced Senescence»), l'expression de Twist est associée à la croissance en faible adhérence et à la formation de tumeurs chez la souris. Ces deux études montrent donc une coopération entre les oncogènes Myc et Ras et le facteur de transcription de l'EMT, Twist.

En permettant à la fois l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses et en favorisant la transformation, le processus d'EMT pourrait permettre l'allongement de la durée de vie des cellules différenciées et leur donnerait la possibilité d'être à l'origine de la

tumorigenèse. Cette notion de plasticité bouscule les modèles stochastique et hiérarchique. Les cellules à l'origine du cancer colorectal, maintenant la croissance tumorale, peuvent alors être aussi bien des cellules souches que des cellules différenciées. Les stratégies thérapeutiques anticancéreuses devraient alors cibler simultanément ces deux types de cellules et éventuellement les cellules stromales (Figure 8).

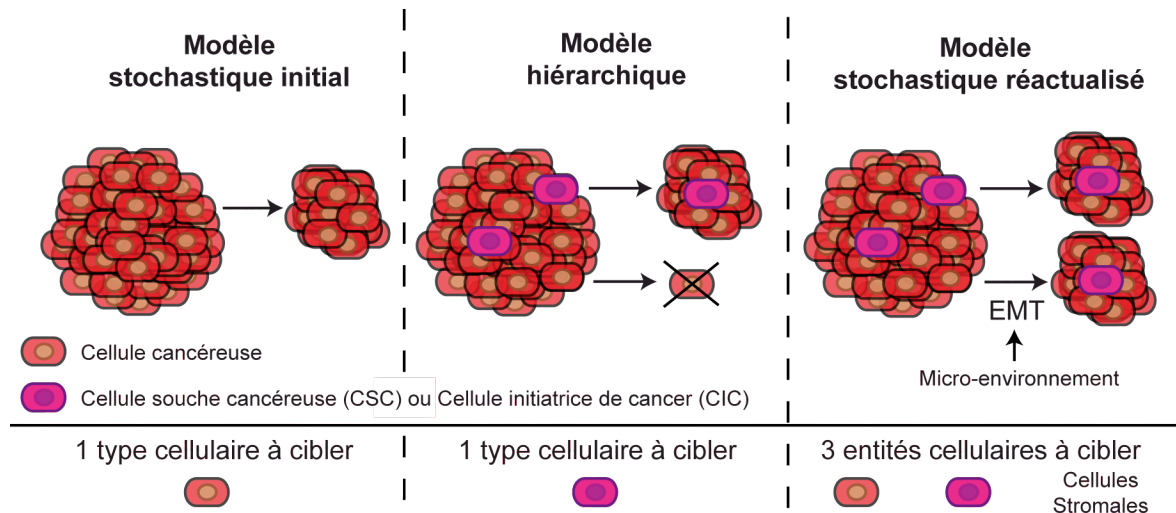


Figure 8 : Différents modèles de carcinogenèse. Selon le modèle stochastique, les cellules cancéreuses étaient perçues comme biologiquement homogènes, des facteurs internes ou externes expliquant l'hétérogénéité observée. Chaque cellule serait capable de reformer une tumeur. Puis la théorie des cellules souches cancéreuses a été établie. Elle repose sur l'idée que la tumeur se maintient grâce à des cellules souches qui sont à la tête de la hiérarchie tumorale et sont les seules capables de régénérer la tumeur. Les cellules matures constituent la majorité de la masse tumorale mais n'ont pas de capacités tumorigéniques. Enfin, le concept de plasticité a été amené avec le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui permet à une cellule différenciée d'acquérir des caractéristiques de cellules souches cancéreuses. Induit par des signaux micro-environnementaux, l'EMT permettrait de conférer des capacités tumorigéniques aux cellules différenciées. Ces différents modèles supposent différentes stratégies thérapeutiques.

Au cours de la progression tumorale l'hétérogénéité s'accroît en raison de l'émergence continue de clones de cellules cancéreuses présentant de nouvelles altérations génétiques (Gerlinger et al., 2012). Au stade métastatique, cette hétérogénéité est responsable d'un haut niveau de résistance à la chimiothérapie (Burrell & Swanton, 2014). C'est ce qui explique que, pour les patients atteints de tumeurs colorectales disséminées, la survie à 5 ans n'est que de 10% en moyenne alors que le pronostic est bon pour ceux atteints de tumeurs de stade précoce (Brenner et al., 2014). De nouvelles stratégies de traitement doivent donc être proposées pour les cancers métastatiques, tenant compte de l'hétérogénéité tumorale et des mécanismes de plasticité. Pour cela, il faut bien comprendre les mécanismes de suppression tumorale abolis par les cellules métastatiques.

1.1.3. Progression du cancer, caractéristiques des cellules métastatiques.

Le processus métastatique est complexe, et composé de nombreuses étapes (A. F. Chambers, Groom, & MacDonald, 2002) (Chaffer & Weinberg, 2011) (Valastyan & Weinberg, 2011) (Brabletz, 2012). A chacune de ces étapes, beaucoup de cellules meurent, d'autres entrent en quiescence et peu parviennent à repopuler. Quelques études prétendent que le pourcentage de cellules capables de former une métastase sur toutes celles qui accèdent à la circulation serait d'environ 0,02% (Valastyan & Weinberg, 2011). De nombreuses barrières balisent en effet ce long parcours. Avant l'apparition de métastases au niveau macroscopique (macro-métastase), des cellules cancéreuses sont présentes et envahissent les tissus sains des patients sous forme de micro-métastases. Ces cellules peuvent rester quiescentes et être responsables de l'apparition de métastases au bout de plusieurs dizaines d'années après la détection de la tumeur primaire (A. F. Chambers et al., 2002). Lorsque le caractère métastatique d'un cancer est établi, les cellules ont donc traversé toutes ces barrières ce qui les rend plus agressives que les cellules tumorales primaires. Pour mieux comprendre les mécanismes de résistance aux traitements des cancers métastatiques et pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques il faut tenir compte des caractéristiques de ces deux types de cellules métastatiques : les cellules quiescentes et les cellules constituant une macro-métastase.

1.1.3.1. Itinéraire des cellules métastatiques, caractère passif et actif du processus métastatique.

Les différentes étapes du processus métastatique sont le détachement des cellules de la masse tumorale, la traversée de la membrane basale, le déplacement au sein du stroma, l'entrée dans les vaisseaux sanguins par intravasation, la survie dans la circulation, la sortie par extravasation et enfin la prolifération au niveau du site secondaire. Alors que de nombreuses étapes du processus démontrent son caractère actif, les vaisseaux sanguins pourraient constituer un filtre rendant ce processus en partie passif. En effet, le fait d'être dans la circulation sanguine ne permettrait pas aux cellules d'accéder à l'ensemble du corps. Le système vasculaire comprend des vaisseaux de très petite taille, ce sont les capillaires, où la majorité des cellules seraient prises au piège (A. F. Chambers et al., 2002). Les cellules cancéreuses ont un diamètre moyen de 20µm alors que celui des capillaires serait inférieur à 10µm. La pression peut permettre à certaines cellules de traverser ce filtre. Mais l'arrêt des cellules cancéreuses dans un organe serait majoritairement passif. Il dépendrait donc du circuit entre l'organe source et le prochain,

en aval. Par exemple, les métastases les plus fréquentes, à la suite d'un cancer colorectal, sont situées dans le foie et les poumons. En effet, les vaisseaux sortants du côlon et du rectum passent par le foie puis par les poumons. Le caractère passif ou actif de cette étape est tout de même la source d'un débat (Schlüter et al., 2006). D'autres étapes requièrent l'acquisition indéniable de certaines caractéristiques, décrites ci dessous, qui suggèrent que le processus métastatique est actif.

1.1.3.2. Perte d'interaction cellule/cellule : la transistion épithélio-mésenchymateuse (EMT).

Les changements moléculaires et morphologiques lors du processus d'EMT.

Comme décrit plus haut, l'EMT permet l'acquisition de caractéristiques mésenchymales chez une cellule épithéliale. Ce processus requière la perte d'expression de l'E-cadhérine («Epithelial-cadherin»), une protéine d'adhésion (Figure 9). Au niveau basal, des points d'adhésion focaux lient les cellules épithéliales à la membrane basale, constituée de matrice extra-cellulaire. Au niveau latéral, les cellules sont liées entre elles par les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes. L'E-cadhérine fait partie d'une famille qui comprend la N-cadhérine («neural cadherin») et la VE-cadhérine («vascular endothelial cadherin»). Présente au niveau des jonctions adhérentes, elle participe au maintien de l'intégrité du tissu épithélial (Gall & Frampton, 2013). Sa partie cytoplasmique est liée au complexe p120-caténine. Les caténines α et β connectent l'ensemble au cytosquelette d'actine. Le regroupement de ces protéines confère une force d'adhérence et stabilise l'adhésion. Ainsi piégée, la β -caténine ne peut pas activer la voie WNT. La perte de l'E-cadhérine déstabilise les jonctions adhérentes et active donc la voie WNT ce qui entraîne d'importants changements phénotypiques. Initialement mise en évidence lors de l'embryogenèse, la perte d'expression de l'E-cadhérine est induite par des facteurs de transcription qui répriment l'expression de son gène. Ces facteurs appartiennent à diverses familles : les protéines à doigt de zinc telles que Zeb (Zeb1 et Zeb2) et Snail (Snail1, Snail2 (Slug) et Snail3), les facteurs bHLH (basic Helix-Loop-Helix) tels que Twist (Twist1 et Twist2), et le facteur Prrx1 (Sánchez-Tilló et al., 2012) (Ocaña et al., 2012). Ce processus s'accompagne de la perte de la polarité, caractéristique des cellules épithéliales, et de l'induction de l'expression de la vimentine, spécifique des cellules mésenchymateuses (Figure 9). L'expression de la vimentine, en plus de la perte de l'E-cadhérine contribue à la réorganisation du cytosquelette. Ceci explique les changements morphologiques et contribue à l'acquisition de propriétés migratoires et d'invasion observées lors de l'EMT.

Contexte d'application et conséquences du processus d'EMT.

De nombreux régulateurs de ce processus sont décrits dans la littérature : les protéines de la matrice extra-cellulaire (ECM) comme le collagène et l'acide hyaluronique; les membres des familles TGF- β , Wnt, Notch; les facteurs de croissance FGF, EGF, HGF, PDGF, VEGF; les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK); les voies MAPK, PI3K/AKT, src; les ARN non codants miR-200, miR-101, miR-34 et miR-9... (Thiery & Sleeman, 2006) (Moustakas & Heldin, 2007) (Nieto & Cano, 2012) (De Craene & Berx, 2013). La régulation de l'EMT est dépendante du contexte cellulaire, du tissu concerné, il est difficile de décrire globalement ce phénomène. Dans le tissu mammaire, les voies du TGF- β et de WNT seraient essentielles à la mise en place et au maintien de l'EMT. Dans ce contexte, le maintien de l'EMT se ferait de façon autocrine. Il serait dépendant de la sécrétion du TGF- β , de l'inhibition de la voie des BMP, via l'induction de l'expression de ses antagonistes, et de l'activation de la voie WNT (Scheel et al., 2011). Ces conditions sont retrouvées au niveau du front invasif tumoral.

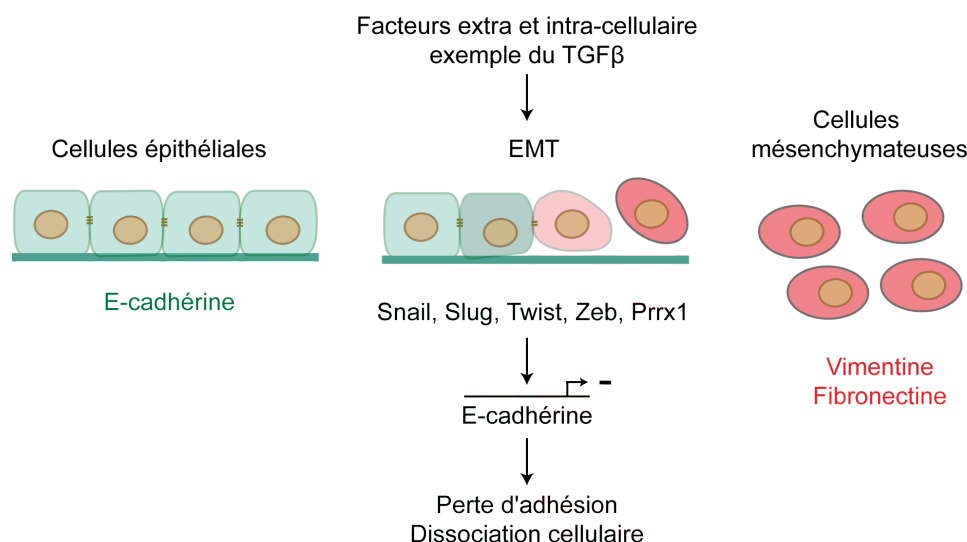


Figure 9 : La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Les cellules épithéliales sont liées les unes aux autres grâce notamment aux jonctions adhérentes. Au niveau moléculaire, ces jonctions se composent d'E-cadhérine qui est perdue lors de l'EMT. Induits par divers signaux, ce processus requière l'inhibition transcriptionnel de l'E-cadhérine par des facteurs tels que Snail, Slug, Twist et Zeb. La dissociation cellulaire s'accompagne de l'expression de la vimentine et de la fibronectine dans les cellules mésenchymateuses.

Cette plasticité cellulaire pourrait permettre aux cellules tumorales d'origine épithéliale de maintenir un phénotype dédifférencié et d'acquérir des propriétés de migration et d'invasion nécessaires au processus métastatique (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009). Par exemple, l'inhibition de l'expression de Twist bloque le processus métastatique dans des expériences de xénogreffe de lignées mammaires chez la souris (J. Yang et al., 2004). L'EMT, induite par le TGF- β , serait aussi accompagnée

d'une augmentation de la sensibilité aux signaux invasifs médiés par l'EGF (Wendt, Smith, & Schiemann, 2010). La perte de l'E-cadhérine permettrait l'augmentation de l'activité de l'EGFR et de kinases en aval comme FAK («Focal Adhesion Kinase»). Ces signaux aboutiraient à une augmentation du pouvoir métastatique. En plus de maintenir un caractère dédifférencié et de favoriser l'échappement aux mécanismes de suppression tumorale, l'EMT serait donc une étape importante qui faciliterait l'acquisition de caractéristiques métastatiques au niveau du front invasif en coopération avec le micro-environnement. La génération de cellules métastatiques implique une augmentation de l'hétérogénéité et complique d'autant plus la stratégie thérapeutique.

1.1.3.3. Bourgeonnement cellulaire : rôle des protéines de la famille Rho et des métallo-protéases matricielles.

Fonctionnement de la voie Rho dans la migration et l'invasion cellulaire.

Lors de l'EMT, la perte de l'E-cadhérine libère les filaments d'actine qui étaient liés au complexe E-cadhérine/ β -caténine. La réorganisation des micro-filaments et des microtubules est essentielle au processus métastatique. Elle dépend de la voie des GTPases de la famille Rho composée des protéines Rho (RhoA, RhoB and RhoC), Rac et cdc42 («cell division control protein 42») (Narumiya, Tanji, & Ishizaki, 2009) (Amano, Nakayama, & Kaibuchi, 2010). La forme, la structure et la contractilité des cellules dépendent en partie des fibres de stress. Elles sont constituées de filaments d'actine liés entre eux par des molécules de myosine. Les protéines de la famille Rho régulent la formation de ces fibres en activant ROCK («Rho-associated coiled-coil forming kinase») et mDia («mammalian homolog of Drosophila diaphanous»). ROCK participe à l'activation de la myosine et mDia est responsable de la production des filaments d'actine (Narumiya et al., 2009). Ces deux actions conjointes permettent la formation de fibres de stress. Lors de la migration, les cellules se polarisent. Au niveau du front migratoire, il y a formation de protubérances (lamellipodes et filopodes) alors que, de l'autre côté, la cellule se rétracte (Figure 10). De façon ponctuelle, les protubérances sont stabilisées par des liaisons avec la matrice extra-cellulaire. Ces liaisons se stabilisent et se déstabilisent par intermittence lors de la migration. Cela dépend du déplacement des intégrines de l'arrière vers l'avant de la cellule grâce à un système d'endocytose et de transport, via les endosomes de recyclage (Ulrich & Heisenberg, 2009). L'avant et l'arrière de la cellule sont les lieux de différentes signalisations. Rac, cdc42 et mDia sont très actifs à l'avant de la cellule où ils participent à la formation des protubérances et des points d'adhésion focaux (Figure 10). En revanche, RhoA et ROCK sont actifs à l'arrière de la cellule où ils permettent la rétraction de la queue cellulaire en inhibant la liaison des intégrines aux protéines de la

matrice extra-cellulaire. Dans la littérature, lors du processus d'invasion, deux types de mouvements sont décrits (Yilmaz & Christofori, 2009). Le mouvement amiboïde, dû à la formation des lamelipodes et des filopodes, est observé sur une surface plane à deux dimensions c'est-à-dire sur un substrat de culture, in vitro (Figure 10). In vivo, l'invasion de la matrice extra-cellulaire par des cellules se fait en trois dimensions. Ce mouvement est qualifié de mésenchymal (Figure 10). Il dépend aussi de la dégradation de cette matrice par les métallo-protéases (MMP) qui sont exprimées au niveau des podosomes, aussi appelés invadopodes lorsque les cellules sont transformées. Les invadopodes interviennent dans l'invasion du stroma mais aussi dans l'intravasation et l'extravasation.

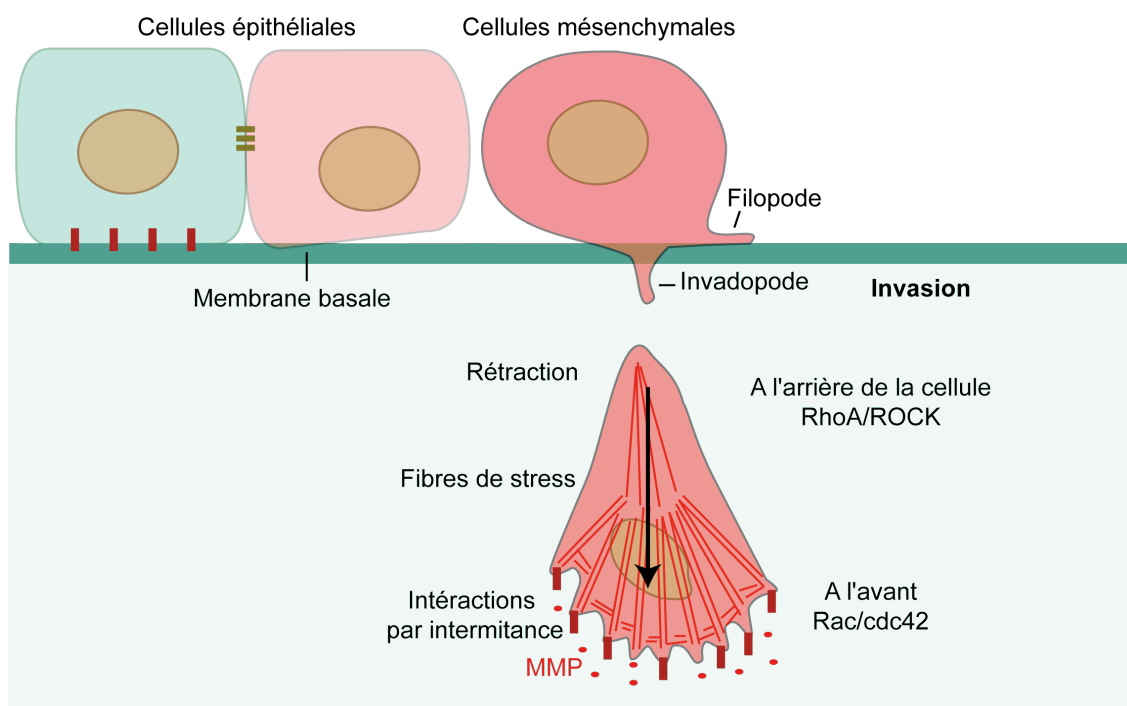


Figure 10 : L'invasion dépend de la voie Rho. Au cours de la progression métastatique, les cellules cancéreuses envahissent la matrice extra-cellulaire. Pour cela les cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques de cellules mésenchymales et forment des bourgeonnements cellulaires. In vitro, en deux dimensions, ces bourgeonnements sont appelés filopodes. In vivo, l'invasion dépend de la formation d'invadopodes. Grâce à la réorganisation des fibres de stress par la voie Rho et à l'établissement d'interactions intermittentes entre les intégrines et les protéines de la matrice extracellulaire, les cellules peuvent se déplacer au sein du stroma. Les métallo-protéases matricielles permettent une dégradation de la matrice extra-cellulaire facilitant le déplacement de la cellule.

Activation de cette voie au niveau du front invasif des tumeurs colorectales.

Des protubérances cytoplasmiques sont détectées au niveau du front invasif des tumeurs colorectales agressives (Zlobec & Lugli, 2010). Ce bourgeonnement tumoral pourrait être régulé en partie par la voie Rho comme le concluent plusieurs études. L'équipe de Olivier De Wever a montré que HGF, sécrété par les myofibroblastes, pourrait activer Rac1 via c-

Met et favoriser le processus d'invasion (De Wever, 2004). Dans les cancers colorectaux, RhoA et Rac1 pourraient aussi être activés par la voie PI3K/AKT/mTOR et participeraient à l'induction de l'EMT et au pouvoir métastatique (Gulhati et al., 2011). Dans ces cancers, lorsque SMAD4 est absent, la voie BMP active la voie Rho pour augmenter les capacités métastatiques des cellules (Voorneveld et al., 2014). L'inactivation complète de SMAD4, sur les deux allèles, est d'ailleurs détectée dans 95% des cancers colorectaux métastatiques (Miyaki et al., 1999). L'utilisation d'inhibiteurs de ROCK réduit le nombre de métastases dans des expériences de xénogreffe chez la souris (Voorneveld et al., 2014). La voie Rho est donc considérée comme essentielle à la migration et au processus métastatique et pourrait donc constituer une cible pour la chimiothérapie des cancers colorectaux notamment ceux dans lesquels SMAD4 est inactivée.

1.1.3.4. Modification de l'interaction cellule/matrice extra-cellulaire et résistance à l'anoikis.

Rôle des interactions cellule/matrice extra-cellulaire.

Lors de l'invasion des cellules cancéreuses dans le stroma et lors de leur passage dans la circulation sanguine, les cellules modifient ou perdent donc leurs interactions avec la matrice extra-cellulaire ce qui induit normalement la mort cellulaire (Figure 11). Les intégrines sont les protéines qui permettent l'interaction entre les cellules et la matrice extra-cellulaire. Ce sont des molécules transmembranaires hétérodimériques composées d'une chaîne α et d'une chaîne β (Yilmaz & Christofori, 2009). Les mammifères comptabilisent 18 chaînes α et 8 chaînes β . Vingt quatre combinaisons existent avec des affinités différentes pour les protéines matricielles conférant une certaine spécificité à l'interaction. Les intégrines interagissent avec le cytosquelette d'actine via un complexe protéique constitué notamment d'ILK («integrin-linked kinase»). ILK a un rôle dans le maintien de la structure du complexe et dans la signalisation associée à l'activation des intégrines. Cette signalisation complexe fait intervenir FAK («Focal adhesion kinase»), Src, GSK3- β (glycogen synthase-kinase-3 β), AKT et la voie Rho. La survie des cellules épithéliales dépend des connections qu'elles établissent avec la matrice extra-cellulaire. Cette matrice constitue un réseau complexe de protéines comprenant les fibres de collagène, les laminines, les molécules de fibronectine, les protéoglycanes et des facteurs solubles. Les cellules épithéliales interagissent avec ces protéines via les intégrines au niveau des points d'adhésion focaux. L'anoikis est décrite comme la mort cellulaire résultant de ce défaut d'interaction (Frisch & Screaton, 2001). Elle aboutit à l'apoptose dépendante des caspases. La survie des cellules cancéreuses dans un nouvel

environnement dépend donc des mécanismes de résistance à l'anoikis. L'acquisition de cette résistance est une étape vers la formation de cellules plus agressives.

Mécanismes de résistance à l'anoikis.

Plusieurs études mettent en cause l'EMT et ses effecteurs dans la résistance à l'anoikis. Parmi elles, un article intéressant utilise un modèle d'EMT induite après sur-expression du récepteur à activité tyrosine kinase TrkB dans des cellules épithéliales de rat (Smit & Peeper, 2011). Les auteurs montrent que l'EMT est dépendante de Zeb1 et que cette voie inhibe la mort cellulaire en réponse à la perte d'adhésion. Un shRNA dirigé contre Zeb1 induit l'augmentation du clivage de la caspase 3 lorsque les cellules sont cultivées en condition de faible adhésion. De plus, ce shRNA diminue l'apparition de lésions métastatiques chez des souris nude après injection en sous-cutanée (Smit & Peeper, 2011). Les processus d'EMT et de résistance à l'anoikis sont donc liés. L'arrêt du cycle cellulaire peut aussi conférer une résistance à l'anoikis. C'est l'objet d'étude de l'équipe de Joan Brugge. L'arrêt du cycle cellulaire induit par la sur-expression de p16 et p21 ou par l'utilisation de mimosine ou d'aphidicolin inhibe l'expression du pro-apoptotique Bim suite à la perte d'adhésion (Collins et al., 2005). ERK régule la stabilité de Bim, en le phosphorylant, il l'adresse au E3 ubiquitin ligases responsables de sa dégradation. L'activation de ERK, suite à l'arrêt du cycle cellulaire, induit donc une résistance à l'anoikis. La chimiothérapie, via l'induction de p21 ou p16, pourrait donc également induire cette résistance.

Les facteurs de croissance EGF et IGF et l'expression de leur récepteur EGFR et IGFR activent les voies des MAPK, de PI3K/AKT et de src. Plusieurs études mettent donc en cause ces voies oncogéniques dans l'inhibition de l'anoikis (Reginato et al., 2003) (Irie et al., 2010) (Muranen et al., 2012) (Carduner et al., 2014). Dans le cas des cellules de cancer du côlon, leur survie dans le foie dépendrait par exemple de la voie de l'IGFR. Cette voie est activée via l'inhibition du miR-493. La sur-expression de ce miRNA, dans des cellules HCT116, diminue le nombre de métastases dans le foie, après injection de ces cellules dans la rate des souris (Okamoto et al., 2012). Après cette injection, les cellules sont bien détectées dans le foie mais elles meurent au bout de quelques jours. Le même résultat est obtenu en utilisant des cellules où IGFR est sous-exprimé. La voie de l'IGFR est en effet impliquée dans la résistance à l'anoikis en activant la voie PI3/AKT (Ravid, Maor, Werner, & Liscovitch, 2004) (W. Zhang et al., 2005) (Martin et al., 2006) (Sachdev, Zhang, Matise, Gaillard-Kelly, & Yee, 2010). En favorisant l'expression de protéines anti-apoptotiques ou en déstabilisant les protéines à domaine BH3, ces voies inhibent l'apoptose induite par une modification de l'interaction cellule/matrice extra-

cellulaire et favorisent donc la progression métastatique et la résistance à la chimiothérapie. Dans les cancers colorectaux métastatiques, l'activation de l'IGFR serait associée à un mauvais pronostic chez les patients traités avec du cetuximab ou du panitumumab, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR (Scartozzi et al., 2010). (Hörndler et al., 2011) (Huang, Xu, & Khambata-Ford, 2012). L'inhibition de l'IGFR pourrait donc être intéressante dans le traitement de cancers colorectaux métastatiques. Dans ces cancers, des anticorps dirigés contre ce récepteur ainsi que des inhibiteurs de son activité kinase sont utilisés dans des études cliniques de phase I et II (Ewing & Goff, 2011). En restaurant la sensibilité à l'anoikis, ces molécules pourraient bloquer le processus métastatique.

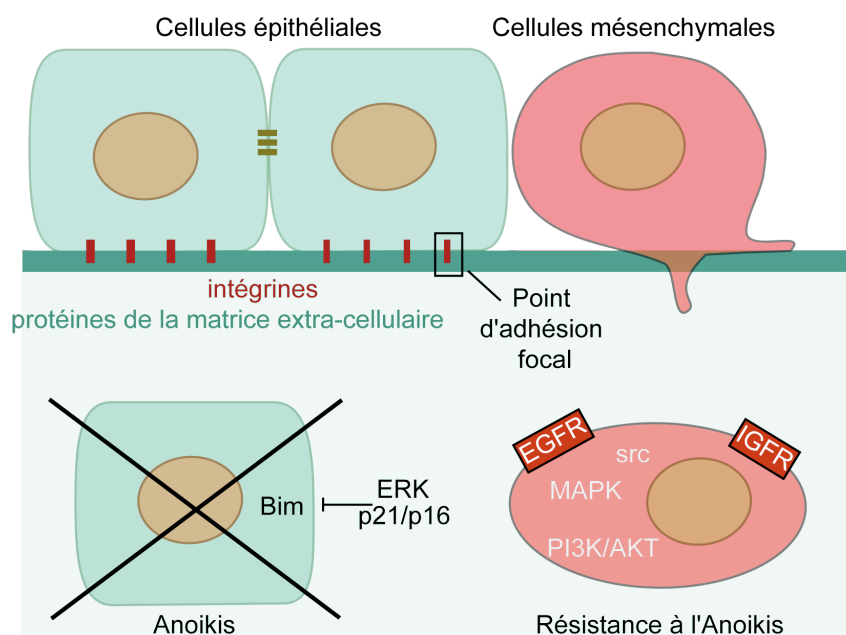


Figure 11 : Le mécanisme d'anoikis. La survie des cellules épithéliales dépend des interactions qu'elles établissent avec les protéines de la matrice extra-cellulaire via les intégrines. Lors du processus métastatique, les cellules modifient ces interactions et peuvent mourir selon le processus appelé anoikis. Les cellules métastatiques développent des mécanismes de résistance à l'anoikis faisant intervenir les voies de l'EGFR/IGFR, MAPK/PI3K/AKT. De plus l'arrêt du cycle médié par p21 et p16 peut bloquer la mort cellulaire résultant de ce défaut d'interaction.

1.1.4. Conclusion : L'hétérogénéité tumorale des cancers colorectaux doit être prise en compte dans les nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le modèle de génération du cancer colorectal, proposé en 1990 par Eric Fearon et Bert Vogelstein, a été très repris. Il décrit l'accumulation d'altérations génétiques, touchant notamment les gènes APC, Ras et TP53, responsables de la carcinogenèse colorectale. Les traitements utilisés à l'époque sont majoritairement des traitements génotoxiques, ciblant uniquement les cellules proliférantes. Suite aux travaux de John Dick notamment, la notion de cellule souche cancéreuse a modifié notre façon de concevoir la thérapie anticancéreuse. Par opposition au modèle stochastique, le modèle hiérarchique stipule que les tumeurs sont constituées de cellules matures et de cellules souches cancéreuses (CSC), foncièrement différentes les unes des autres. La dérégulation des voies WNT, Notch et BMP dans les cellules souches serait responsable de la désorganisation des cryptes colorectales et de la genèse du cancer colorectal. Comme leur version normale, ces cellules souches seraient à la tête de la hiérarchie anormale de la crypte et généreraient des cellules plus différenciées. Cela implique que les CSC sont à l'origine du cancer et que la croissance tumorale repose sur elles. Dans les leucémies, dans lesquelles ce modèle a été initialement décrit, les CSC sont rares et essentiellement quiescentes. Les traitements génotoxiques classiques, ciblant les cellules proliférantes, tueraient donc la majorité des cellules cancéreuses mais pas les plus importantes. Les CSC seraient alors responsables des rechutes observées. Les stratégies thérapeutiques doivent donc évoluer pour tenir compte de cette hétérogénéité tumorale et cibler préférentiellement les CSC.

Les modèles stochastique et hiérarchique décrits précédemment sont actuellement compliqués par la notion de plasticité cellulaire. Le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateux (EMT), permettrait en effet à des cellules matures d'acquérir des caractéristiques de cellules souches. Dans les tumeurs, les cellules pourraient moduler leur état de différenciation. N'importe quelle cellule tumorale aurait donc la capacité de devenir une CSC après l'élimination des CSC à un instant t . Cela implique une remise en cause de l'approche thérapeutique ciblant les CSC. Les nouvelles stratégies doivent prendre en compte cette modulation de l'hétérogénéité tumorale. Le ciblage simultané des cellules différenciées et non différenciées serait théoriquement optimal. La plasticité pourrait être régulée par des facteurs sécrétés par les cellules stromales au niveau du front invasif tumoral. L'utilisation de facteurs inhibant la communication entre les cellules tumorales et les cellules stromales pourrait alors aussi améliorer la réponse à la chimiothérapie. Ces notions de CSC, de plasticité et de micro-environnement

complexifient la théorie des stratégies thérapeutiques à mettre en oeuvre. En effet, il faut tenir compte à la fois de la coexistence de cellules proliférantes et non proliférantes mais aussi de cellules tumorales et stromales.

En plus de l'hétérogénéité des cellules à cibler jusque là, les tumeurs pourraient être constituées de plusieurs clones de cellules génétiquement différentes (Figure 12). Au cours de la progression tumorale, de nouveaux clones seraient constamment générés. Grâce à l'EMT et aux voies BMP/Rho et IGFR/PI3K/AKT, des cellules perdent l'adhésion caractéristique des cellules épithéliales et deviennent invasives et résistantes à l'anoikis. En acquérant ces caractéristiques métastatiques, les cellules sont responsables de la propagation de certains clones, provenant du site primaire, vers de nouveaux sites où, en formant une tumeur secondaire, de nouveaux clones émergent encore (Figure 12). Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses échappent aux mécanismes de suppression et acquièrent donc potentiellement une résistance intrinsèque au traitement. En raison de l'échappement à de très nombreux mécanismes de suppression tumorale et à leur haut niveau d'hétérogénéité, les cancers métastatiques sont alors très difficiles à traiter. L'hétérogénéité des cellules à cibler est un défi pour les futures thérapies anti-cancéreuses (Figure 12). Des thérapies ciblées innovantes ouvriraient les perspectives d'une personnalisation des traitements en fonctions de caractéristiques génétiques, épigénétiques et phénotypiques des tumeurs et des caractéristiques micro-environnementales des sites tumoraux primaire et secondaires.

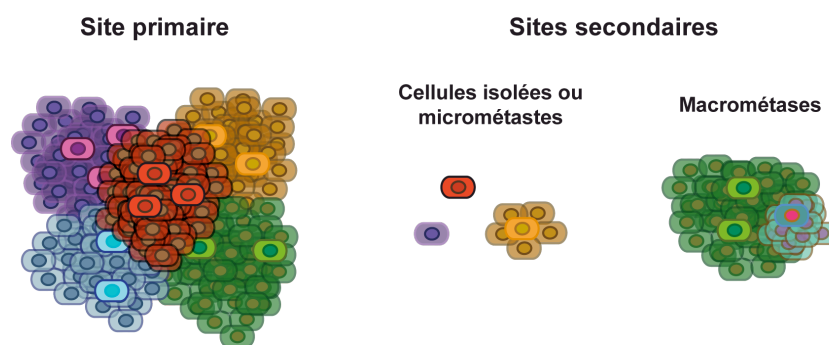


Figure 12 : Hétérogénéité tumorale au stade métastatique. La polyclonalité tumorale se caractérise par la présence de différents clones possédant des altérations génétiques distinctes au sein d'une tumeur. Chaque clone serait composé de cellules différenciées et non différenciées. Sur les sites secondaires, des cellules isolées peuvent être présentes ainsi que des micro ou macro-métastases. Le niveau d'hétérogénéité des cellules à cibler pour les nouvelles stratégies thérapeutiques des cancers métastatiques est très important.

La partie suivante est consacrée à la chimiothérapie, notamment celle du cancer colorectal, à ses conséquences cellulaires et moléculaires et aux mécanismes d'échappement. Malheureusement, les traitements utilisés actuellement prennent peu en compte l'hétérogénéité tumorale ce qui explique probablement les rechutes observées.

1.2. Déterminants de la réponse à la chimiothérapie : de la détection des dommages à l'induction des mécanismes de mort cellulaire.

1.2.1. Les chimiothérapies dans le traitement du cancer colorectal.

1.2.1.1. Place de la chimiothérapie dans la prise en charge du patient.

Le traitement du cancer colorectal (CCR) dépend du stade de la maladie (Di Franco, Todaro, Dieli, & Stassi, 2013) (HASINCA, 2012). Lorsque la tumeur est bien localisée et que les ganglions lymphatiques ne sont pas touchés, stades I et II, la chirurgie est suffisante pour traiter le CCR. Lorsque les lésions n'ont pas été complètement retirées lors de la coloscopie, l'exérèse des parties altérées est alors réalisée par chirurgie. Dès que la tumeur présente des signes de dissémination, d'atteintes ganglionnaires ou métastatiques, stades III et IV, la chimiothérapie est proposée en complément de la chirurgie. Une radiothérapie peut aussi être réalisée dans le cas particulier du cancer rectal. Trois modes de chimiothérapie sont possibles : néo-adjuvante, adjuvante et palliative. La chimiothérapie néo-adjuvante, réalisée avant la chirurgie, permet de diminuer la taille tumorale et de faciliter le travail du chirurgien. La chimiothérapie adjuvante, réalisée après la chirurgie, permet de diminuer le risque de rechute. Enfin, la chimiothérapie palliative a pour but de ralentir la propagation de la maladie lorsque la dissémination métastatique est trop importante pour envisager l'exérèse des lésions. Comme dit plus haut, les approches thérapeutiques classiques sont souvent dépourvues de ciblage particulier ce qui pourrait expliquer la chimiorésistance observée dans les cancers métastatiques, qui sont hautement hétérogènes (Figure 12).

1.2.1.2. Place des molécules génotoxiques dans la chimiothérapie du CCR.

Différents types de molécules sont utilisées en chimiothérapie. La chimiothérapie classique comprend des molécules cytotoxiques qui inhibent la synthèse de l'ADN, interagissent avec l'ADN ou bloquent des protéines nécessaires à la prolifération. Dans tous les cas, ces molécules induisent des cassures de l'ADN. Ce sont des molécules génotoxiques. Toutes les cellules qui se divisent sont touchées. Cela les rend peu spécifiques et elles sont associées à des phénomènes de toxicité importante. Dans le CCR, les traitements génotoxiques utilisés sont le 5-fluorouracil (5FU), l'oxaliplatine et l'irinotécan. Utilisée depuis moins longtemps, la thérapie ciblée comprend des molécules qui inhibent de façon relativement spécifique des facteurs supposés essentiels aux cellules cancéreuses : des facteurs de croissance, leurs ligands ou la transduction du

signal. L'efficacité de ces traitements repose sur l'idée que les cellules cancéreuses ont une addiction pour certaines voies oncogéniques (Luo, Solimini, & Elledge, 2009). L'inhibition de ces voies permettrait donc d'améliorer la réponse des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Le cetuximab et le panitumumab, des anticorps dirigés contre l'EGFR, le bevacizumab, un anticorps dirigé contre le VEGF, et le regorafenib un inhibiteur de l'activité des tyrosines kinases constituent les armes de la thérapie ciblée utilisée dans le traitement du CCR. La notion d'addiction reste cependant mal définie dans ce cancer.

Les choix des différentes molécules et des combinaisons de traitement sont faits par une équipe de spécialistes lors de réunions de concertation pluridisciplinaire (HASINCA, 2012). Le rapport bénéfice/risque est alors évalué. De nombreux facteurs sont pris en compte comme l'état général du patient, les caractéristiques moléculaires de la tumeur, la rapidité de progression de la maladie et la toxicité des molécules. Le phénotypage et le génotypage de la tumeur sont préconisés avant l'utilisation de certaines molécules chimiothérapeutiques. Par exemple, les voies de métabolisation de l'irinotécan doivent être fonctionnelles. L'irinotécan est hydrolysé par la carboxylestérase 2 en sn38. Ce dernier est éliminé par l'organisme via un processus de glucurono-conjugaison assuré par l'enzyme UGT1A1 (UDP Glucuronosyltransferase 1A1). Un défaut de glucurono-conjugaison du sn38 entraîne de sévères toxicités gastro-intestinales et hématologiques. 20% de la population n'exprime pas de façon optimale l'UGT1A1 et donc ne métabolise pas bien le sn38 (Pourquier & Lansiaux, 2011). La FDA préconise donc de rechercher le polymorphisme responsable de ce défaut d'expression de l'UGT1A1 afin d'adapter la dose d'irinotécan. Aussi, lorsque la voie des MAPK est constitutivement active, les inhibiteurs de l'EGFR ont une efficacité réduite et ne sont donc pas indiqués. Les mutations de Ras, activant la protéine de façon constitutive, sont fréquentes dans les cancers colorectaux. Le génotypage de Ras est donc requis avant l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR.

De façon simplifiée, dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques, deux types de combinaisons peuvent être utilisées en première et deuxième ligne. Celle à base d'oxaliplatine (FOLFOX) et celle à base d'irinotécan (FOLFIRI). Ces traitements génotoxiques sont toujours combinés au 5-fluorouracil et souvent à une molécule de thérapie ciblée, lorsque des lignes successives sont nécessaires, comme le cetuximab, le panitumumab ou le bevacizumab (Schmiegel et al., 2010) (Schmoll et al., 2012) (Chibaudel, Tournigand, André, & de Gramont, 2012). Plusieurs lignes de traitements peuvent se succéder avec dans les dernières lignes l'utilisation du regorafenib, l'inhibiteur de l'activité des tyrosines kinases. Dans mon travail de thèse, je me suis focalisé sur l'irinotécan, un inhibiteur de l'ADN topoisomérase I.

1.2.1.3. Zoom sur les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I.

1.2.1.3.1. Historique et utilisation des inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I.

Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I utilisés actuellement proviennent de la camptothécine. Cette molécule a été isolée en 1958 à partir de l'écorce d'un arbre chinois, *Camptotheca acuminata*, par Wall et son équipe. Alors que son mode d'action n'est pas encore connu, elle montre un effet anticancéreux intéressant. Cependant, son manque de solubilité et ses effets secondaires ralentissent son étude. C'est en 1985 que les recherches sur la camptothécine s'intensifient grâce à la découverte de sa cible : l'ADN topoisomérase I (Hsiang, Hertzberg, Hecht, & Liu, 1985). Des dérivés plus solubles et moins toxiques émergent alors, comme le topotécan et l'irinotécan. Par la suite, d'autres inhibiteurs de topoisomérase, dérivés de la camptothécine ou non, ont été découverts. Mais le topotécan et l'irinotécan sont les seuls inhibiteurs de l'ADN topoisomérase à être commercialisés actuellement (Basili & Moro, 2009). Le topotécan, un analogue hydrosoluble de la camptothécine, est indiqué dans le traitement de cancers ovariens métastatiques et de cancers du poumon à petites cellules. L'irinotécan, aussi appelé CPT-11, est un dérivé semi-synthétique utilisé dans le traitement de cancers colorectaux (Schmoll et al., 2012). C'est une pro-drogue qui est convertie en SN38 par les carboxylestérases plasmatiques et cellulaires. Ce métabolite actif est très puissant puisqu'il inhibe 1000 fois plus efficacement l'ADN topoisomérase I que la pro-drogue. La majeure partie des effets de l'irinotécan dépend donc de sa métabolisation en sn38 (Kawato, Aonuma, Hirota, Kuga, & Sato, 1991).

1.2.1.3.2. Génération des dommages de l'ADN.

Rôle de l'ADN topoisomérase I.

Les ADN topoisomérases sont des enzymes essentielles au remodelage de l'ADN. Un haut niveau de compaction ne permet pas aux complexes enzymatiques de réplication, de transcription et de réparation, d'accéder à l'ADN. Les hélicases sont responsables de l'augmentation du super-enroulement de part et d'autre de la zone d'ouverture, en rendant accessible l'ADN aux enzymes du métabolisme (Pommier, Leo, Zhang, & Marchand, 2010). Les ADN topoisomérases interviennent dans la relaxation de la double hélice en diminuant les tensions mécaniques dues au super-enroulement. Il existe deux types d'ADN topoisomérases : I et II. Les enzymes de type I clivent un des brins de l'ADN alors que celles de type II clivent les deux brins. Ici, nous nous intéressons uniquement aux ADN topoisomérases de type I (TOP1). Ces enzymes sont elles-même subdivisées en

deux types, IA et IB. Cette différence est fonction du brin d'ADN auquel ces enzymes se lient. Seules les ADN topoisomérases de type IB sont les cibles du sn38, sujet de mon travail de thèse. Chez l'homme, ce groupe est constitué de la topoisomérase I nucléaire et de la topoisomérase I mitochondriale. L'action de l'ADN topoisomérase I se réalise en deux étapes : le clivage de l'ADN lié à l'enzyme, puis la religation de la cassure générée. Le clivage permet une rotation spontanée de l'hélice d'ADN et donc une diminution de la tension au sein de l'ADN.

Génération des dommages de l'ADN par les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I.

Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I se lient au complexe de clivage ADN-TOP1 et empêchent la ligature des fragments (Figure 13). Ceci conduit à des lésions simple-brin d'ADN qui se transforment en cassures double-brin d'ADN après collision avec des complexes enzymatiques (Pommier, 2006). Les dommages de l'ADN, générés par les inhibiteurs de TOP1, sont plus importants lorsque les cellules sont en division. En effet, au moment de la réplication de l'ADN, les cellules sont particulièrement sensibles à l'inhibition de la TOP1. Durant cette phase, les cassures double-brin sont causées par la collision entre le complexe ADN-TOP1-sn38 et la fourche de réplication. En réponse, plusieurs voies sont alors activées permettant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des cassures de l'ADN et la mort cellulaire. De façon à coordonner ces événements, la cellule met en place de nombreuses cascades de signalisation appelées DDR («DNA-damage response»).

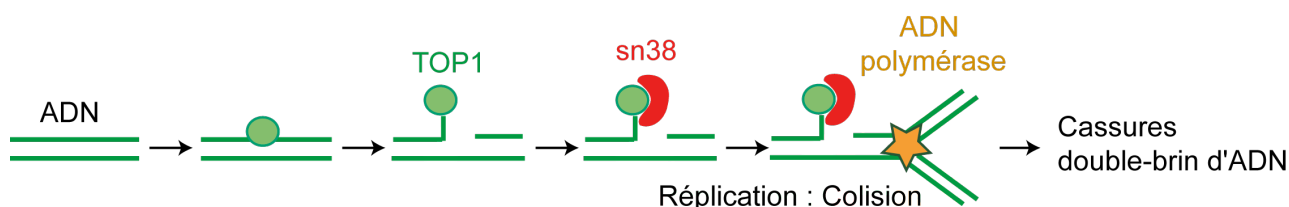


Figure 13 : Mode d'action du sn38. La TOP1 diminue les tensions au sein de la double hélice d'ADN en clivant un des brins de l'ADN. Le brin clivé peut alors entrer en rotation puis l'enzyme religue la brèche. Le sn38 s'insère entre l'ADN et la TOP1 et empêche l'étape de religation. Lors de la réplication, les complexes ADN-sn38-TOP1 entrent en collision avec les complexes de réplication ce qui génère des cassures double-brin d'ADN.

1.2.1.3.3. Les inhibiteurs de la topoisomérase I ciblent les cellules proliférantes.

Comme décrit plus haut, l'hétérogénéité tumorale constitue un défi à relever pour les nouvelles stratégies thérapeutiques. Le ciblage des différentes cellules constituant les tumeurs doit permettre d'améliorer la réponse au traitement. La réponse cellulaire associée à l'inhibition de la topoisomérase I est dépendante des cassures de l'ADN. Ces cassures surviennent majoritairement dans les cellules proliférantes au moment de la

réplication de l'ADN. L'irinotécan touche donc préférentiellement les cellules proliférantes au sein des tumeurs. La présence de cellules quiescentes ou de cellules souches au sein des tumeurs serait alors responsable d'une résistance à ce traitement. Théoriquement, l'irinotécan devrait être combiné à des traitements ciblant ces cellules potentiellement résistantes. Une meilleure compréhension des mécanismes de mort cellulaire induits par les traitements utilisés actuellement devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles dont dépendent les cellules résistantes. La chimiothérapie doit en effet s'adapter à l'hétérogénéité intra-tumorale en diversifiant ses cibles.

1.2.2. Réponses cellulaires associées aux dommages de l'ADN.

1.2.2.1. Détection des dommages de l'ADN.

De nombreuses protéines sont recrutées au niveau de la cassure et participent à la signalisation des dommages de l'ADN. Le complexe RPA («Replication Protein A») se lie aux cassures simple-brin d'ADN alors que les complexes Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) ou KU se lient aux cassures double-brin. Suite à la liaison de ces protéines, les kinases DNA-PK («DNA Dependant Protein Kinase»), ATM («Ataxia Telangiectasia Mutated») et ATR («Ataxia Telangiectasia and RAD3-related») sont activées pour coordonner la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) (Pommier, 2006). Elles induisent notamment la phosphorylation de l'histone H2AX de part et d'autre de la zone lésée (I. M. Ward & Chen, 2001) (Stiff et al., 2004) (An et al., 2010) (Figure 14). Ce variant de l'histone H2A est phosphorylé sur son résidu sérine 139, il est alors appelé γ -H2AX. Cet évènement est très précoce puisqu'il interviendrait quelques minutes après la génération des dommages. γ -H2AX est retrouvé dans de nombreux contextes de stress génotoxique et est un marqueur reconnu des cassures double-brin d'ADN (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998) (Redon et al., 2002) (Fernandez-Capetillo, Lee, Nussenzweig, & Nussenzweig, 2004) (Mah, El-Osta, & Karagiannis, 2010). γ -H2AX serait une marque épigénétique qui permettrait le recrutement de complexes qui modifient la structure de la chromatine pour la rendre accessible aux systèmes de réparation (Thiriet & Hayes, 2005) (Figure 14). Par exemple, l'histone acétyl-transférase (HAT) NuA4 est recrutée au niveau des foci de γ -H2AX (Downs et al., 2004). Cette HAT permet l'acétylation de l'histone H4 et donc l'ouverture de la chromatine ((Utiley, Lacoste, Jobin-Robitaille, Allard, & Cote, 2005). En plus des foci γ -H2AX, d'autres structures peuvent recruter des complexes de remodelage de la chromatine (Redon et al., 2010). Lors de ces dommages, PARP («Poly(ADP-Ribose) Polymerase») s'homodimérise et catalyse la formation d'une chaîne polymérique d'ADP-ribose PAR («Poly(ADP-Ribose)») sur l'ADN. Cette chaîne pourrait servir également de

plateforme d'accueil pour les complexes de réparation (Figure 14). La dissociation des nucléosomes, entraînant la décondensation de la chromatine, est indispensable à l'accessibilité de l'ADN pour les complexes de réparation. Le remodelage de la chromatine a donc un impact important dans la réparation de l'ADN (Thiriet & Hayes, 2005) (Rossetto, Truman, Kron, & Cote, 2010).

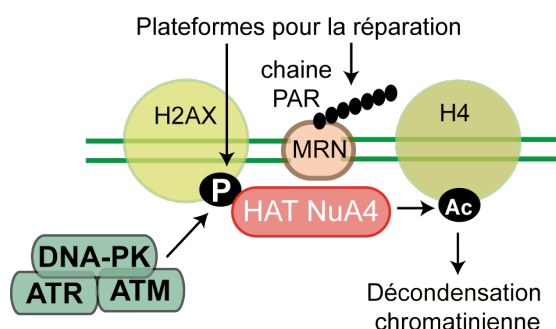


Figure 14 : Détection des dommages de l'ADN. Le complexe MRN se lie aux cassures double-brin d'ADN ce qui active les kinases ATM, ATR et DNA-PK qui phosphorylent H2AX sur la sérine 139. Cette modification post-traductionnelle permet le recrutement de nombreuses protéines intervenant dans le remodelage de la chromatine et dans la réparation de l'ADN. Parmi ces protéines, l'histone acétyl-transférase NuA4 acétyle l'histone H4 ce qui induit une décondensation chromatiniennne. Une autre plateforme pour la réparation est la chaîne de PAR catalysée par PARP.

1.2.2.2. Réparation des dommages de l'ADN.

Différents types de mécanismes de réparation existent en fonction des types de dommages. Les complexes ADN-TOP1-sn38 sont nommés «complexe suicide». La réparation de ces lésions passe par l'excision de la TOP1 et du sn38. Cette excision peut être réalisée par la tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) ou par les complexes XPF/ERCC1, Mre11/Rad50; et Mus81/Eme1 (Osman & Whitby, 2007) qui ont une activité endonucléase. Après l'excision, deux mécanismes de réparation peuvent intervenir au niveau des cassures d'ADN double-brin: la réparation «Non homologue end joining» (NHEJ) et la réparation par recombinaison homologue (HR). Le choix entre ces deux mécanismes dépendrait de la phase du cycle cellulaire et des protéines p53PB1 et BRCA1 (Daley & Sung, 2014). En phase G1, p53PB1 serait recruté au niveau des dommages et induirait la réparation NHEJ (Panier & Boulton, 2013). En phase G2, un complexe composé notamment de BRCA1 remplacerait p53PB1 sur le site de cassure et permettrait à la HR d'opérer. Le NHEJ consiste à relier les deux extrémités au niveau du site de cassure (Khanna & Jackson, 2001), elle est source d'erreurs. Les lésions générées par les inhibiteurs de TOP1 s'accumulent en phase S, c'est donc la HR qui répare préférentiellement les dommages (Daley & Sung, 2014). Les effecteurs de ce processus,

les protéines Rad51, Brca1 et Brca2, utilisent l'autre copie, intacte, du chromosome comme matrice pour polymériser les fragments manquants via la formation de jonctions Holliday (Khanna & Jackson, 2001) (Heyer, 2004). Ces processus de réparation de l'ADN demandent du temps et requièrent un ralentissement, voire un arrêt du cycle cellulaire.

1.2.2.3. Arrêt du cycle cellulaire, les différents points de contrôle du cycle cellulaire et leurs défaillances.

1.2.2.3.1. Points de contrôle au niveau de la transition G2/M.

Activation du complexe cycline B/CDK1 pendant la transition G2/M normale.

Lors de la phase G2, le complexe cycline B/CDK1 permet la progression vers la mitose. Des complexes se forment au fur et à mesure de l'augmentation de l'expression de la cycline. Cependant, l'activation du complexe requiert la phosphorylation sur le résidu Thr161 et la perte des deux phosphorylations inhibitrices Thr14 et Tyr15 sur CDK1. Les kinases Myt1 et Wee1 sont respectivement responsables de ces deux dernières modifications post-traductionnelles. Alors que la phosphorylation de la Thr161 est médiée par le complexe CAK composé de Cdk7, Cyclin H et MAT1, la dé-phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 est réalisée par les phosphatases CDC25 A, B et C (van Vugt & Medema, 2005) (Timofeev, Cizmecioglu, Settele, Kempf, & Hoffmann, 2010).

La première phosphatase à intervenir serait CDC25 B. Son activation par phosphorylation sur la sérine 353 est attribuée à la kinase Aurora A (Cazales et al., 2005). Ce premier événement induirait l'activation du complexe cycline B/CDK1 qui par une boucle d'amplification activerait CDC25 A et C et inactiverait les kinases Wee1. Ces deux derniers événements seraient aussi médiés par PLK1 qui permettrait d'amplifier le signal d'activation du complexe. Cette sérine-thréonine kinase, dont l'activation dépend d'Aurora A, interviendrait aussi dans la localisation nucléaire de la cycline B indispensable à l'activité de CDK1. Ces cascades de phosphorylations permettent une régulation fine de l'activation du complexe cyclineB/CDK1 et de la progression vers la mitose.

Mécanismes bloquant l'activation du complexe cycline B/CDK1 : le point de contrôle G2/M.

En plus de la phosphorylation de l'histone H2AX, DNA-PK, ATM et ATR ont un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire en interfase. Les kinases Chk1 et Chk2, une fois activées par ATM et ATR, sont essentielles à la réponse aux dommages de l'ADN (Bartek & Lukas, 2001) (Sancar, Lindsey-Boltz, Ünsal-Kaçmaz, & Linn, 2004) (Reinhardt & Yaffe, 2009). En inactivant les phosphatases CDC25 et PLK1 et en activant p53, elles permettent

finalement l'inactivation du complexe cycline B/CDK1 (Figure 15). De façon directe, Chk1 et/ou Chk2 phosphorylent CDC25A sur la Ser123, CDC25B et CDC25C sur la Ser216. Ces phosphorylations induisent la dégradation des phosphatases CDC25 et permettent aussi l'interaction avec les protéines de la famille 14-3-3 qui bloquent leur activité notamment en les séquestrant dans le cytoplasme (Boutros, Dozier, & Ducommun, 2006). L'inhibition de CDC25C est aussi médiée par l'inactivation de PLK1 (Smits et al., 2000) (Tsvetkov & Stern, 2005). En effet, suite au traitement par l'adryamicin, la phosphorylation activatrice de PLK1 sur la Thr210 est inhibée. Lorsque UCN-01, un inhibiteur des kinases Chk1 et Chk2, est aussi administré, cette phosphorylation est restaurée. L'inhibition de PLK1 est donc dépendante de Chk1 et Chk2. De plus, elle serait aussi médiée par l'interaction avec BRCA1 qui bloquerait son activité kinase (Zou, Rezvani, Wang, Lee, & Zhang, 2013). L'inactivation d'Aurora A, responsable de l'activation de PLK1, est aussi observée lors de dommages de l'ADN (Cazales et al., 2005). Elle est due notamment à la phosphorylation de Bora sur la Thr501 par ATR ce qui sensibilise ce co-facteur d'Aurora A à la dégradation (Qin, Gao, Yu, Yuan, & Lou, 2013). Les protéines clés de l'activation du complexe cycline B/CDK1, les phosphatases CDC25, et les kinases PLK1 et Aurora A sont donc inactivées par les kinases ATM/ATR/Chk1/Chk2 (Figure 15).

En plus de l'inactivation des protéines intervenant dans le cycle cellulaire, les kinases ATM/ATR/Chk1/Chk2 activent p53 qui inhibe aussi l'activation du complexe cycline B/CDK1 (Figure 15). p53 est stabilisé grâce aux phosphorylations sur le résidu sérine 15 et sérine 20, par les kinases Chk1/Chk2. Ces phosphorylations bloquent l'interaction avec son inhibiteur HDM2 (C. Dai & Gu, 2010) (R. H. Medema & Macurek, 2011). Une fois libéré de HDM2 et stabilisé, p53 agit à différents niveaux. Il module directement la transcription de protéines impliquées dans la régulation de l'activité du complexe cycline B/CDK1. Il inhibe notamment directement la transcription de CDC25 C (St Clair & Manfredi, 2006). De plus, c'est un activateur transcriptionnel de p21 et 14-3-3 σ . p21 inhibe l'activité des complexes cycline/CDK et notamment ceux impliquant CDK2 et CDK1. De plus, p53 inhibe indirectement l'expression d'Aurora A et ceci à plusieurs niveaux (C.-C. Wu et al., 2012). Au niveau transcriptionnel, p53 en activant l'expression de p21 bloque l'activation de CDK2 et donc l'expression des gènes cibles d'E2F3, dont Aurora A. De plus, l'expression de FBW7, une E3 ubiquitin ligase intervenant dans la dégradation de la protéine Aurora A, dépend également de p53. Les niveaux d'expression de p53 et Aurora A sont donc inversement corrélés (C.-C. Wu et al., 2012).

Via CDC25C, p21, 14-3-3 σ et Aurora A, p53 agit donc à différents niveaux pour inhiber l'activation du complexe cycline B/CDK1 et donc ralentir l'entrée en mitose. Le niveau

d'activation de p53 module donc le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire lors de dommages de l'ADN (Bartek & Lukas, 2001). Les kinases ATM/ATR/Chk1/Chk2 bloquent donc l'activation du complexe cycline B/CDK1 via de multiples protéines dont les phosphatases CDC25, PLK1, Aurora A et p53 (Figure 15). Ces kinases sont donc essentielles à l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M.

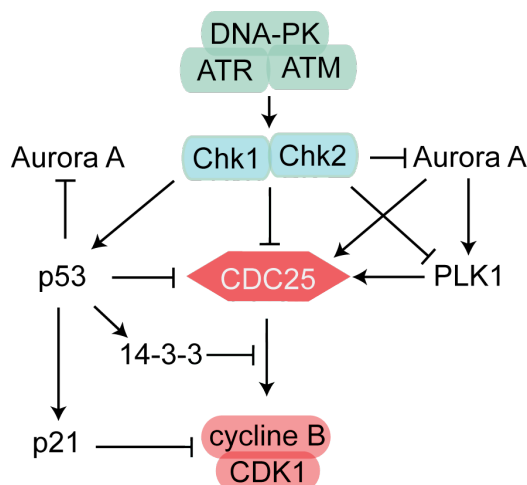


Figure 15 : Activation du point de contrôle G2/M. En réponse aux dommages de l'ADN, le blocage de l'activation du complexe cycline B/CDK1 s'exerce de plusieurs manières. Il dépend d'une part de l'inactivation des phosphatases directement par CDC25 par Chk1/Chk2 et p53, et indirectement via l'inactivation d'Aurora A et PLK1. De plus, p53 en activant l'expression de p21 et de 14-3-3 bloque respectivement l'activation du complexe cycline B/CDK1 et l'interaction CDC25/complexe cycline B/CDK1.

Passage du point de contrôle G2/M.

En réponse au traitement, l'accès à la mitose et la progression du cycle cellulaire dépendent donc théoriquement de la réparation de l'ADN et de l'inactivation des voies ATM/ATR/Chk1/Chk2 et p53. Cependant, l'accès à la mitose n'est pas toujours bloqué aux cellules ayant des cassures double-brin d'ADN. C'est le phénomène d'adaptation ou de «slippage» en anglais (Syljuåsen, 2007). Les raisons de cette défaillance ne sont pas complètement comprises. Ce point de contrôle est qualifié de négligeant (Löbrich & Jeggo, 2007). En effet, de faibles dommages de l'ADN ne sont pas suffisants pour activer le point de contrôle de la phase G2/M. De plus, même lorsque ces dommages sont importants, les cellules peuvent accéder à la mitose. L'équipe de Robert Margolis avait montré que l'activation de p53 et de ses effecteurs p21 et 14-3-3σ ne suffit pas au maintien de l'arrêt au niveau de la transition G2/M (Andreassen, Lacroix, Lohez, & Margolis, 2001a). Il semble donc que l'arrêt pendant la transition G2/M ne soit que transitoire et que la mitose constitue le point de contrôle essentiel des dommages de l'ADN. Les voies de signalisation en mitose seraient donc essentielles à la réponse à chimiothérapie.

1.2.2.3.2. Points de contrôle pendant la mitose.

Progression normale de la mitose : de la métaphase à l'anaphase.

Lors des premières étapes de la mitose, les chromosomes se condensent et sont captés par les microtubules du fuseau. L'alignement des chromosomes est observé au centre de la cellule au niveau de la plaque métaphasique. Dans des conditions normales, l'anaphase se traduit par la séparation des deux chromatides de chaque chromosome qui sont tractées par les microtubules et réparties aux deux pôles de la cellule mère. La cytokinèse est la dernière étape permettant l'étranglement de la cellule mère et la dissociation des deux cellules filles. Alors que les premières étapes dépendent du complexe cycline B/CDK1, le passage de la métaphase à l'anaphase est associé à la dégradation de la cycline B et donc à l'inactivation de ce complexe. Cette dégradation est médiée par APC/C («Anaphase Promoting Complex/Cyclosome»), une E3 ubiquitin ligase dont l'activité dépend de ses cofacteurs CDH1 et CDC20. Ces cofacteurs sont impliqués dans la reconnaissance des protéines ciblées. Le déclenchement de l'anaphase dépend donc de CDC20 qui reconnaît et permet l'ubiquitylation de la cycline B et de la sécurine par APC/C (Figure 16). La sécurine est un inhibiteur de la séparase, une protéase de la famille des caspases qui dégrade la cohésine. Cette dernière lie les chromatides sœurs entre elles.

Activation du point de contrôle du fuseau : blocage de la transition métaphase/anaphase.

Lors de dommages importants de l'ADN, en réponse à la chimiothérapie, des anomalies de fixation sont présentes entre les microtubules du fuseau mitotique et les chromatides au niveau des kinétochores (Heijink, Krajewska, & van Vugt, 2013). Ces anomalies de fixation entraînent l'activation du point de contrôle du fuseau (SAC ou «Spindle Assembly Checkpoint») (Foley & Kapoor, 2013). Ce point de contrôle bloque le déclenchement de l'anaphase jusqu'à ce que chaque kinétochore soit correctement associé aux microtubules du fuseau. Le CPC («Chromosomal Passenger Complex») joue un rôle essentiel dans la détection et dans la déstabilisation des mauvais appariements (van der Waal, Hengeveld, van der Horst, & Lens, 2012). Ce complexe est composé de la kinase Aurora B et de trois protéines permettant la localisation du complexe : INCENP («INner CENtromere Protein») survivine, borealine (Carmena, Wheelock, Funabiki, & Earnshaw, 2012). Localisé au niveau du centromère, il est sensible à la tension exercée par les microtubules des deux pôles sur les kinétochores. Lorsque cette tension n'est pas égale, comme dans le cas de cassures de l'ADN, Aurora B active le complexe du point de contrôle mitotique (MCC ou «Mitotic Checkpoint Complex») au niveau du kinétochore concerné. Ce complexe est composé de MAD2, BubR1 et BUB3. En séquestrant CDC20, le cofacteur d'APC/C, le point de contrôle mitotique bloque la dégradation de la cycline B et de la sécurine (Figure

16). La transition métaphase/anaphase est ralentie, la cellule est arrêtée en mitose (Mikhailov, Cole, & Rieder, 2002). Parallèlement aux voies ATM/ATR/Chk1/Chk2 et p53 activées en G2, le point de contrôle du fuseau est donc un médiateur essentiel de la réponse à la chimiothérapie lors de la progression mitotique.

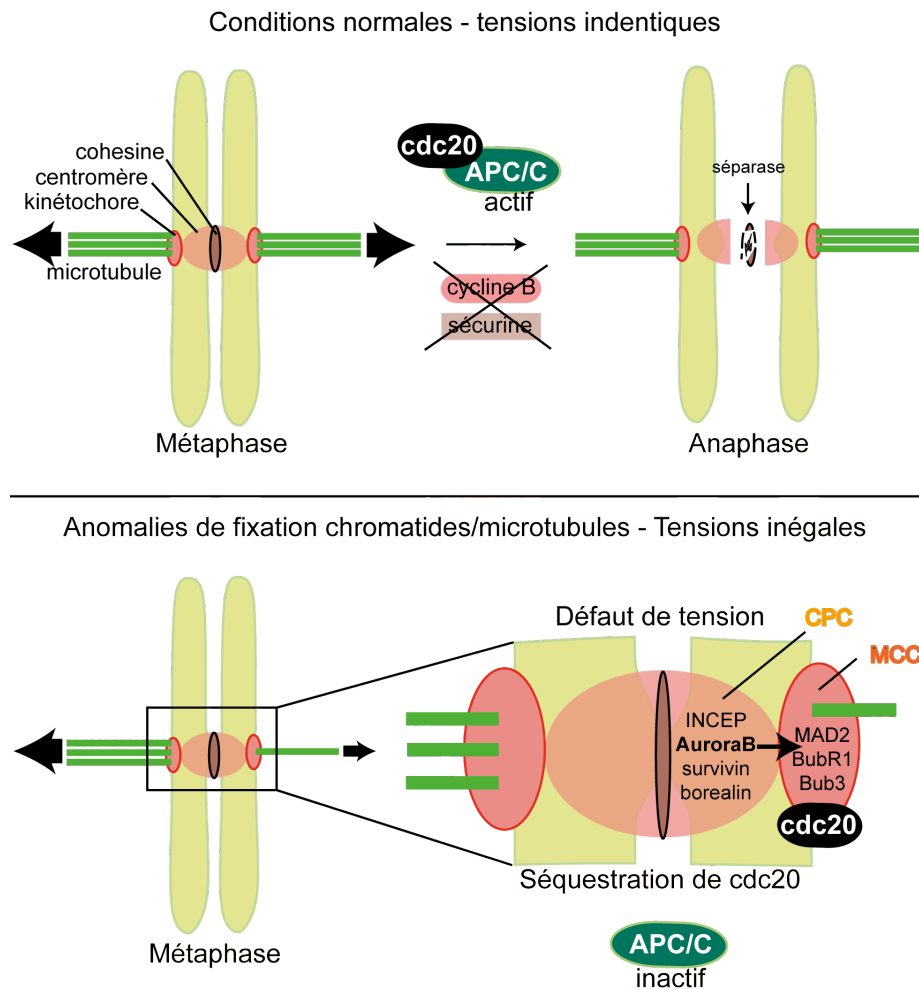


Figure 16 : Activation normale et points de contrôle de la transition métaphase/anaphase. En conditions normales, le déclenchement de l'anaphase nécessite l'activation du complexe APC/C-CDC20 qui participe à la dégradation de la sécurine et de la cycline B. La dégradation de la sécurine active la séparase et donc le clivage de la cohesine, qui liait les chromatides entre elles, et celle de la cycline B inactive CDK1 ce qui participe à la sortie de mitose. Lorsque des anomalies de tension existent entre les deux chromatides, Aurora B, qui fait partie du complexe CPC («Chromosomal Passenger Complex»), active le complexe du point de contrôle mitotique (MCC) qui séquestre CDC20. APC/C reste alors inactif jusqu'à ce que les anomalies soient résolues.

Défaillance du point de contrôle du fuseau due à l'épuisement du stock de protéines.

La mitose est une phase particulière du cycle cellulaire où la condensation des chromosomes suspend le processus de transcription (Blagosklonny, 2007). Le taux des protéines intervenant pendant cette phase dépend donc de leur propre stabilité et

éventuellement de celle de leur ARNm. Plus la cellule passe du temps en mitose, plus elle est sensible aux processus de dégradation. La cycline B et la protéine de survie Mcl-1 font partie des protéines sensibles à ces processus de dégradation. En mitose, Mcl-1 est la cible du complexe cycline B/CDK1, toujours actif lorsque la cellule est bloquée avant l'anaphase. Suite à un arrêt mitotique, CDK1 phosphoryle Mcl-1 sur la Thr92 ce qui l'adresse à l'E3 ubiquitin ligase APC/C-CDC20. Cette phosphorylation module l'ubiquitylation de la protéine et donc sa stabilité. En effet, la perte de l'expression de Mcl-1, due à la phosphorylation par CDK1, est inhibée lors d'un traitement au MG132, un inhibiteur du protéasome (Chu, Terrano, & Chambers, 2012). Cette phosphorylation de Mcl-1 est aussi observée lors d'une mitose normale mais son niveau est beaucoup plus important lors d'un arrêt prolongé en mitose en raison de l'activité importante du complexe cycline B/CDK1 (Harley, Allan, Sanderson, & Clarke, 2010). Bcl-xL, une autre protéine anti-apoptotique, est aussi la cible de la kinase CDK1 (Terrano, Upreti, & Chambers, 2010). Contrairement aux phosphorylations de Mcl-1, celles sur Bcl-xL n'induisent pas sa dégradation mais elles bloquent son activité anti-apoptotique. Le complexe cycline B/CDK1 bloque donc l'activité des protéines anti-apoptotiques durant un arrêt prolongé en mitose. Cependant, comme Mcl-1, la cycline B n'est pas épargnée par ces phénomènes de dégradation. En effet, lorsque l'arrêt en mitose dure, la cycline B est aussi dégradée lentement ce qui aboutit à l'inactivation du complexe cycline B-CDK1 et à une sortie de mitose (Blagosklonny, 2007). De façon étonnante, cette dégradation de la cycline B serait médiée par APC (J. Lee, Kim, Margolis, & Fotedar, 2010). Cette défaillance du point de contrôle du fuseau n'est pas comprise mais on peut imaginer que les protéines participant au maintien de ce point de contrôle sont elles aussi soumises à des processus d'inactivation et de dégradation.

Compétition entre la vitesse de dégradation de la cycline B et l'inactivation des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL : apoptose ou sortie de mitose?

Le devenir des cellules durant la mitose dépend donc de deux voies qui entrent en compétition : l'activation des signaux de mort, via l'inhibition des protéines Mcl-1 et Bcl-xL, et la dégradation de la cycline B. Ces deux voies sont dépendantes l'une de l'autre. En effet, d'une part, l'inactivation de Mcl-1 et Bcl-xL est notamment médiée par le complexe cycline B/CDK1. Et, d'autre part, la survie, médiée par Mcl-1 et Bcl-xL favorise le prolongement de la mitose au cours duquel la cycline B se dégrade progressivement. Les protéines anti-apoptotiques sont effectivement directement mise en cause dans l'échappement à la mort cellulaire en mitose. Par exemple, dans des cellules mammaires, après un arrêt en mitose induit par le paclitaxel, 48% des cellules parviennent à sortir de mitose et échappent à la mort cellulaire. Ce pourcentage passe à 4% lorsque le traitement

est combiné à l'ABT-737, un inhibiteur des protéines Bcl-2 et Bcl-xL. La même observation est réalisée avec un shBcl-xL (Bah et al., 2014). Bcl-xL a donc un rôle essentiel dans la survie cellulaire au cours d'un arrêt en mitose. Lors de cet arrêt, Bcl-xL serait phosphorylé sur la Ser62 par CDK1 (Terrano et al., 2010). La transfection du mutant S62A réduit la mort cellulaire suite au traitement par la vinblastine, ce qui montre l'importance de cette phosphorylation sur le devenir des cellules en mitose. Une autre étude de la même équipe, met en avant le rôle de Bcl-xL et Mcl-1 dans l'échappement à la mort mitotique dans les cellules colorectales HT29 et DLD1 (Sakurikar, Eichhorn, & Chambers, 2012). Les phosphorylations de Bcl-xL et Mcl-1 par CDK1 en mitose inhibent donc leur activité anti-apoptotique et/ou induisent leur dégradation ce qui sensibilisent les cellules à la mort cellulaire (Harley et al., 2010) (Eichhorn, Sakurikar, Alford, Chu, & Chambers, 2013). Cependant d'autres modifications contrebalancent ces signaux. CDK1 pourrait inhiber l'activité de la caspase 9 en la phosphorylant sur le résidu Thr125 (Allan & Clarke, 2007).

Les vitesses respectives de l'inactivation des protéines anti-apoptotiques et de la dégradation de la cycline B déterminent donc le devenir des cellules en réponse aux traitements (Figure 17). Ce sont les travaux de Karen Gascoigne qui ont initié cette notion de compétition entre les vitesses d'activation de ces deux voies (Gascoigne & Taylor, 2009). Grâce à un système de vidéo en «time-lapse», cette étude décrit le devenir des cellules de lignées en réponse à des drogues anti-mitotiques. L'inhibition des caspases et la sur-expression de la cycline B ont montré que la mort en mitose était dépendante des caspases et du maintien de l'expression de la cycline B (Gascoigne & Taylor, 2009). Lorsque le taux de cycline B serait en dessous d'un certain seuil les cellules pourraient sortir de mitose et échapper à la mort durant cette phase. La vitesse d'activation des caspases serait donc en compétition avec la vitesse de dégradation de la cycline B (Figure 17). La catastrophe mitotique désigne l'ensemble des conséquences d'un arrêt prolongé en mitose (Hayashi & Karlseder, 2013). Lorsque les signaux de mort cellulaire sont induits rapidement et que la cycline B est encore active, l'apoptose est déclenchée. En revanche, le maintien de l'activité et la stabilité des protéines anti-apoptotiques associé à une perte rapide de la cycline B favorise la sortie de mitose («mitotic slippage») (Topham & Taylor, 2013). Les cellules qui sortent de mitose sont alors tétraploïdes en raison de l'absence de cytokinèse. Bcl-xL et Mcl-1 apparaissent donc comme des facteurs déterminants du devenir des cellules lors de la catastrophe mitotique en réponse à la chimiothérapie.

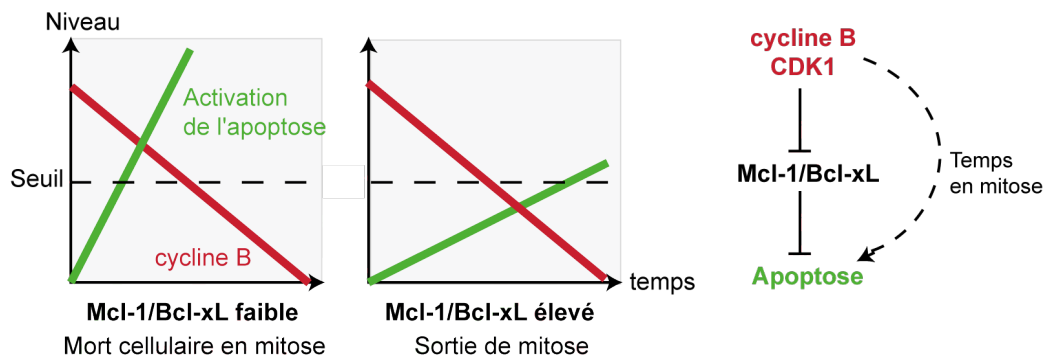


Figure 17 : Compétition entre la vitesse de dégradation de la cycline B et l'induction du processus apoptotique au moment de la catastrophe mitotique. Lorsque le processus mitotique se prolonge, le devenir des cellules dépend des vitesses respectives de ces deux mécanismes. L'induction de l'apoptose dépend notamment du niveau d'activation des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL qui est modulé en mitose par le complexe cycline B/CDK1. Lorsque le niveau d'expression et d'activation de Mcl-1 et Bcl-xL est faible, le processus apoptotique se déclenche rapidement, ce qui favorise la mort cellulaire en mitose. En revanche lorsque ces protéines sont fortement exprimées, l'activation des caspases est plus lente, ce qui favorise une sortie de mitose. Schéma adaptée de Gascoigne et Taylor (Gascoigne & Taylor, 2008).

1.2.2.3.3. Point de contrôle post-mitotique pour les cellules tétraploïdes.

Pendant longtemps la mitose a été considérée comme la dernière barrière aux défauts de ploïdie, qui sont associés à l'instabilité chromosomique et qui peuvent entraîner la tumorigenèse. Mais passée la mitose, d'autres barrières existent. Parmi elles, le point de contrôle G1/S pour les cellules tétraploïdes est important. Ce point de contrôle serait dépendant de p53 (Margolis, Lohez, & Andreassen, 2003). Avant la sortie de mitose, la protéine p53 pourrait s'accumuler en raison de l'inactivation de HDM2, suite aux cassures de l'ADN, et de la longue durée de vie de son ARNm. Lorsque la cellule sort de mitose et reprend la transcription, p53 activerait de façon massive ses gènes cibles dont Bax et p21 (Blagosklonny, 2007). Via l'apoptose ou la sénescence, p53 inactiverait les cellules lors de cette phase G1 post-mitotique (Andreassen, Lohez, Lacroix, & Margolis, 2001b) (Senovilla et al., 2009) (Vitale, Galluzzi, Castedo, & Kroemer, 2011). De plus, p53 pourrait contrôler indirectement le niveau d'expression de Myc et de cycline E. En effet, p53 active l'expression de FBW7 qui est responsable de l'ubiquitinylation de ces protéines et de leur dégradation (Tu et al., 2013) (Finkin, Aylon, Anzi, Oren, & Shaulian, 2008). D'autres études mettent en évidence l'importance de p16 dans le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence chez les cellules tétraploïdes (Panopoulos et al., 2014). Dans cette étude, des fibroblastes primaires deviennent tétraploïdes après le blocage de la cytokinèse par l'utilisation du dihydrocytochalasin B, un inhibiteur d'actine. Après l'élimination de l'inhibiteur les cellules tétraploïde entrent en sénescence. Ce blocage du cycle cellulaire post-mitotique serait dépendant de p16. En effet, dans ces conditions, l'inhibition de p16

par ARN interférence induit une augmentation du pourcentage de cellules polyploïdes (Panopoulos et al., 2014).

En réponse à la chimiothérapie, trois points de contrôle semblent donc être activés successivement (Figure 18). Le premier intervient lors de la transition G2/M et dépend de l'activation des kinases ATM/ATR/Chk1/Chk2. En inhibant l'activation du complexe cycline B/CDK1, ces kinases bloquent l'entrée en mitose. A l'inverse, une fois en mitose, le point de contrôle du fuseau maintient ce complexe actif bloquant ainsi la cellule dans cette phase. L'activité anti-apoptotique des protéines Mcl-1 et Bcl-xL favorise alors la sortie de la mitose. La progression dans le cycle cellulaire des cellules tétraploïdes, résultant de cette sortie de mitose, est alors inhibée par p53 et p16, c'est le point de contrôle en G1/S pour les cellules tétraploïdes. L'ensemble de ces points de contrôle serait donc impliqué dans la réponse au sn38, qui constitue le sujet de cette thèse. Ils aboutissent au déclenchement de mécanismes suppresseurs comme l'apoptose et la sénescence que les cellules tumorales doivent donc inactiver pour survivre (Figure 18).

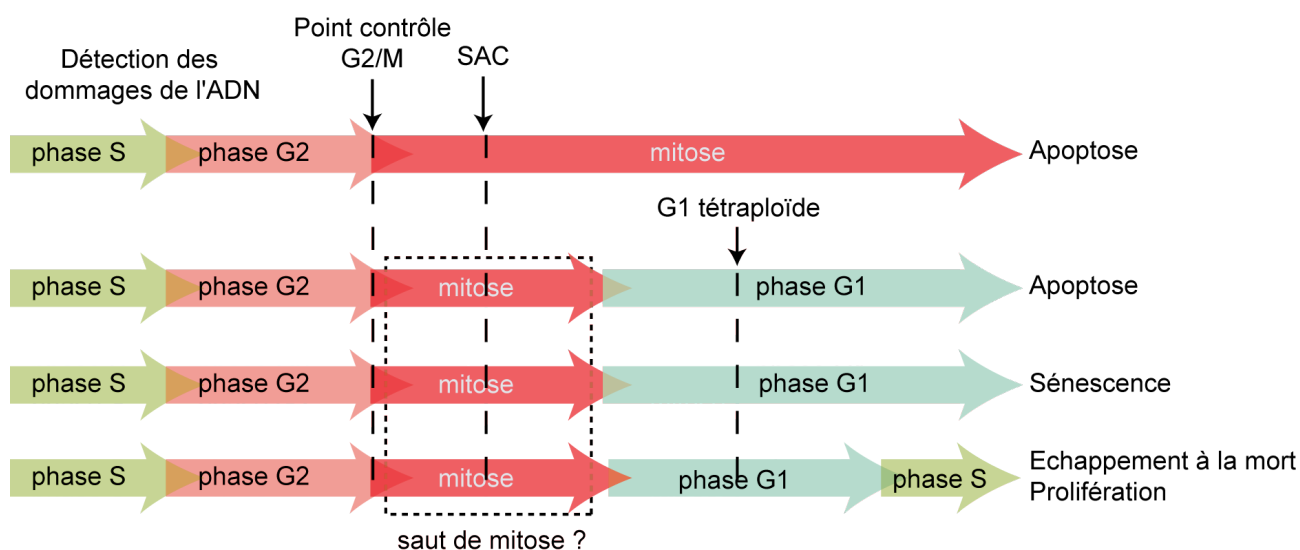


Figure 18 : Devenir des cellules après la détection de dommages de l'ADN. L'apoptose peut être induit en mitose lors de la catastrophe mitotique en raison de l'activation prolongée du SAC ou lors de la sortie de mitose en raison de l'activation du point de contrôle G1 tétraploïde. La sénescence est une autre voie de réponse à ce dernier point de contrôle. Enfin, des cellules peuvent échapper à l'ensemble de ces points de contrôle ou les satisfaire. Elles peuvent continuer leur prolifération.

1.2.2.4. Mécanismes de mort cellulaire induits par la chimiothérapie.

En réponse aux traitements, ces points de contrôle aboutissent à différents types de mort cellulaire. La balance oscille entre un mécanisme irrémédiable, l'apoptose, et un mécanisme qui l'est moins, la sénescence (Vitale et al., 2011). Cette dernière n'est en effet pas vraiment considérée comme une mort cellulaire. D'autres types de mort cellulaire peuvent intervenir mais seuls ces deux mécanismes, bien décrits dans la littérature, seront détaillés dans les parties suivantes.

1.2.2.4.1. Le processus apoptotique.

Suite aux dommages de l'ADN et à l'activation des différents points de contrôle décrits précédemment, l'apoptose peut intervenir en mitose, lors de la catastrophe mitotique, ou à la sortie de mitose. L'apoptose est un processus de destruction cellulaire qui requière la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie («mitochondria outer membrane permeabilisation» ou MOMP) (Galluzzi et al., 2012) (Tait & Green, 2013).

Conséquences de la perméabilisation de la mitochondrie (MOMP).

Lorsqu'elle est effective, la MOMP déclenche l'apoptose de façon dépendante ou indépendante des caspases. Lors d'un arrêt prolongé en mitose, induit par les traitements anti-mitotiques, la mort cellulaire en mitose semble en partie dépendante des caspases (Gascoigne & Taylor, 2008). Les caspases dégradent des composants cellulaires essentiels comme les microtubules ou l'ADN ce qui aboutit à l'éclatement de la cellule. Les caspases sont des cystéines protéases clivant les protéines après un acide aspartique («cysteine dependent aspartate driven proteases») (Alnemri et al., 1996). Elles sont synthétisées sous une forme appelée procaspase et sont activées par clivage. Lors de la réponse aux dommages de l'ADN, c'est la voie intrinsèque de l'apoptose qui intervient. Les caspases les plus décrites dans ce contexte sont la caspase 9, qualifiée d'initiatrice et la caspase 3, qualifiée d'effectrice. Suite à la perméabilisation mitochondriale, la sortie du cytochrome C déclenche la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. En cascade, la caspase 9 clive et donc active la procaspase 3 en caspase 3. D'autres composants mitochondriaux participent au processus apoptotique de façon indépendante des caspases. Par exemple, l'AIF (Apoptosis inducing factor) et ENDOG (endonuclease G) sont responsables de la fragmentation de l'ADN après la MOMP. De façon plus passive, la MOMP est associée à un arrêt de la production d'ATP et à un arrêt de la chaîne respiratoire qui conduit à la sur-expression de ROS. Ces événements nourrissent une boucle d'amplification de l'apoptose (Galluzzi et al., 2012). Comme nous l'avons dit, dans

le contexte de la catastrophe mitotique, le complexe cycline B/CDK1 est impliqué à la fois dans l'activation de la MOMP, via l'inactivation des protéines anti-apoptotiques, et dans l'inhibition de la caspase 9. L'apoptose en mitose et la réponse aux traitements dépendent donc de l'inactivation de Bcl-xL et Mcl-1, permettant la sortie du cytochrome C, mais également du maintien de l'activité de la caspase 9.

Régulation de la MOMP par les protéines de la famille Bcl-2.

La MOMP dépend de la quantité relative et de l'activation des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 19). Les protéines de cette famille se caractérisent par la présence de séquences conservées appelées domaine d'homologie Bcl-2 («Bcl-2 homology domain» ou BH domain). Quatre domaines différents sont recensés : BH1 BH2 BH3 BH4. La combinaison de ces domaines permet de différencier trois groupes de protéines Bcl-2 (Youle & Strasser, 2008). Le premier regroupe les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok qui possèdent les domaines BH1 BH2 et BH3. Même si leur rôle n'est pas encore bien défini, l'insertion de ces protéines dans la membrane mitochondriale et leur oligomérisation sont essentielles à la sortie du cytochrome C et à l'activation des caspases. Le deuxième groupe comprend les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 et A1 qui possèdent pour la plupart un domaine BH de plus que les protéines pro-apoptotiques, le domaine BH4. En interagissant avec les protéines pro-apoptotiques, elles inhibent la formation des oligomères de Bax ou de Bak, principalement en modulant leur conformation. Le troisième groupe contient les protéines à domaine BH3 seul, Bik, Bim, Bid, Bad, Bmf, Noxa, Puma et Hrk. Elles possèdent un domaine BH3 qui leur permet de se fixer aux protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et de les titrer. Ceci a pour conséquence la libération et donc l'activation des protéines pro-apoptotiques.

La spécificité des protéines à domaine BH3 seul pour les protéines anti-apoptotiques varie selon les membres. Par exemple, Bim et Puma peuvent se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques. En revanche, Noxa est spécifique de Mcl-1 et A1, et Bad l'est de Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w (L. Chen et al., 2005) (Youle & Strasser, 2008). Plusieurs études ont montré que certains membres des protéines à domaine BH3 seul peuvent directement interagir et activer les protéines pro-apoptotiques (Czabotar et al., 2013). Bim, Puma et Bid pourraient activer Bax et Bak (Gavathiotis et al., 2008) (Gallenne et al., 2009) (Moldoveanu et al., 2013). Cette caractéristique a permis de regrouper ces protéines sous le terme de «protéines effectrices à domaine BH3 seul». Les autres protéines à domaine BH3 seul qui ne peuvent pas activer directement les protéines pro-apoptotiques sont qualifiées de «sensibilisatrices» (Figure 19). En titrant les protéines anti-apoptotiques, ces dernières dérépriment indirectement Bax et Bak (Leber, Lin, & Andrews, 2010).

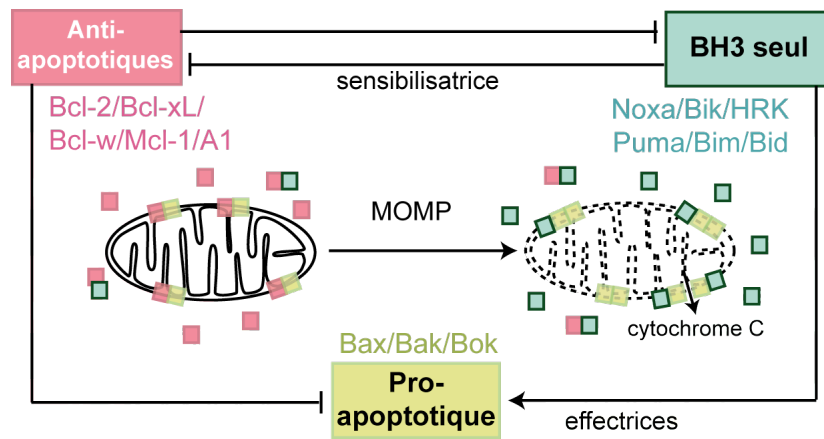


Figure 19 : Régulation de la perméabilisation mitochondriale (MOMP). La MOMP dépend de l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok. Ces protéines doivent s'homodimériser à la membrane mitochondriale pour la perforer. L'interaction protéines pro-apoptotiques/anti-apoptotiques conduit à l'inhibition de cette oligomérisation. Les protéines à domaine BH3 seul contiennent ces signaux anti-apoptotiques. En titrant les protéines anti-apoptotiques ou en activant directement les protéines pro-apoptotiques, les protéines BH3 seul activent la MOMP.

Régulation et dérégulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2.

L'activation d'un oncogène comme Myc ou Ras, induit des mécanismes suppresseurs de mort cellulaire dont l'apoptose. Lors du processus de carcinogenèse, les protéines de survie de la famille de Bcl-2, telles que Bcl-xL et Mcl-1, contiennent ces signaux et permettent la survie des cellules cancéreuses. Cette dépendance illustre le processus d'addiction oncogénique et témoigne du stress constant que doit contrer une cellule lors de son développement tumoral. Inhiber ces protéines de survie constitue une nouvelle approche thérapeutique reposant sur la génération de molécules comme l'ABT737. L'inhibition de Bcl-xL ou Mcl-1 bloque par exemple la croissance des lymphomes reposant sur Myc (Mason et al., 2008) (Kelly et al., 2014). Les tumeurs peuvent donc sur-exprimer ces protéines anti-apoptotiques de façon constitutive.

Concernant les protéines pro-apoptotiques, des mutations de Bax sont décrites dans les cancers présentant un phénotype d'instabilité des microsatellites ce qui est le cas de 15% cancers colorectaux (Rampino, 1997). Lors de dommages de l'ADN, l'expression de Bax est induite par p53. Cependant, l'induction de l'expression de cette protéine pro-apoptotique ne suffit pas à son activation puisqu'elle dépend des protéines effectrices à domaine BH3, Bim, Puma et Bid. La modulation de l'apoptose dépend donc également des protéines à domaine BH3 seul. Ces dernières sont exprimées très faiblement dans des conditions normales et peuvent être sous-exprimées dans les cancers (Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Plusieurs niveaux de régulation sont décrits : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel.

Régulation transcriptionnelle des protéines Bcl-2.

De nombreuses voies régulent l'expression transcriptionnelle des protéines de la famille Bcl-2. Parmi elles, il faut compter par exemple sur p53, p73, PI3K/AKT, E2F, NFκ-B et STAT. La compréhension des mécanismes de régulation est complexe car ils dépendent du type cellulaire et du contexte. En tant que facteur de transcription et activateur de l'apoptose, p53 induit l'expression des protéines à domaine BH3 seul Bad, Noxa et Puma (Jiang, Du, Heese, & Wu, 2006) (Villunger et al., 2003) (J. Yu, Zhang, Hwang, Kinzler, & Vogelstein, 2001). Indépendamment du statut de p53, p73 active aussi l'expression de Noxa (Grande et al., 2012). Foxo3A est un autre facteur de transcription bien décrit de Bim et Puma (Sunters et al., 2003) (You, 2006). Ce facteur est inhibé par la voie PI3K/AKT (Roulston, Muller, & Shore, 2013). Le facteur E2F-1 contrôle également l'expression de Bim, Noxa, Puma et Hrk (Hershko & Ginsberg, 2004). Du côté des protéines anti-apoptotiques, la régulation transcriptionnelle implique plusieurs voies oncogéniques classiques comme celles de Myc, STAT et NF-κB. Par exemple, STAT3 est un activateur transcriptionnel de Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et de la survivine (Wen et al., 2013) (Real et al., 2002) (H. Yu & Jove, 2004). Comme ce qui a déjà été dit, l'induction de l'expression de ces protéines est essentielle pour contrer le stress oncogénique.

Régulation post-transcriptionnelle des protéines Bcl-2 : miRNA.

L'expression des protéines de la famille Bcl-2 est également régulée par des micro-ARN (miR). Le groupe miR-17-92 inhibe l'expression de plusieurs protéines dont Bim (Xiao et al., 2008). La région génique codant pour ce groupe de miR est amplifiée dans plusieurs types de cancers dont des lymphomes. D'autres miR bloquent l'expression de protéines à domaine BH3 seul, comme miR-197 qui a pour cible Noxa et Bmf (Fiori et al., 2014) et miR-200c qui cible Noxa (Lerner, Haneklaus, Harada, & Grandér, 2012). A l'inverse, la perte des miR-15 et miR-16 dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) serait en cause dans la sur-expression de Bcl-2 retrouvée dans ces pathologies. En effet miR-15 et miR-16 inhibent directement l'expression de Bcl-2 dans des expériences in vitro (Cimmino et al., 2005). Aussi, dans des lignées de cholangiocytes l'expression de Mcl-1 est inversement corrélée au taux de miR-29b (Mott, Kobayashi, Bronk, & Gores, 2007). Mcl-1 serait une cible de miR-29b dont le taux est diminué dans les cellules malignes.

Régulation post-transcriptionnelle des protéines Bcl-2 : épissage alternatif.

L'épissage alternatif participe largement à la modulation des fonctions des protéines de la famille Bcl-2 (Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Par exemple, la perte du domaine BH3 de Bim résulte d'une modulation de l'épissage et prive Bim de sa fonction pro-apoptotique (Ng et al., 2012). Egalement, différentes formes de Mcl-1 sont décrites. La première est la

forme complète Mcl-1L qui est connue pour son rôle anti-apoptotique et dont le transcrit comporte 3 exons. Cette forme se compose de plusieurs domaines dont quatre domaines PEST («proline, glutamic acid, serine, and threonine») en N-terminal, de domaines BH3, BH1 et BH2 et enfin d'un domaine transmembranaire en C-terminal. Le transcrit, codant pour la forme complète, peut subir un épissage alternatif qui le prive de son deuxième exon (Bingle, 2000) (Bae, 2000). Ce deuxième exon contient les séquences codant pour le domaine BH1 et pour une partie du domaine BH2. Sans ces deux domaines, ce variant, appelé Mcl-1S, est considéré comme une protéine à domaine BH3 seul. Il interagit avec Mcl-1L et bloque son action. La sur-expression de Mcl-1S induit l'apoptose. Plus récemment, un autre variant, Mcl-1ES a été détecté (J.-H. Kim et al., 2009). Ce variant se caractérise par l'absence de domaines PEST. Ces séquences manquantes pourraient finalement correspondre à un intron de Mcl-1L non identifié. Bcl-xL et Bcl-xS sont les formes longue et courte de Bcl-x. Comme pour Mcl-1, la forme courte Bcl-xS inhibe l'activité de sa forme longue Bcl-xL en raison de la perte du domaine BH1 et d'une partie du domaine BH2 dans la séquence de Bcl-xS (Boise et al., 1993). L'épissage alternatif des ARN de Mcl-1 et Bcl-x dépendrait du complexe ASF/SF2 et de la kinase Aurora A (Moore, Wang, Kennedy, & Silver, 2010). Lors d'un arrêt prolongé en mitose, c'est l'épissage alternatif des formes pro-apoptotiques Bcl-xS et Mcl-1S qui seraient favorisées.

Régulation post-traductionnelle des protéines Bcl-2.

Ces protéines sont aussi régulées au niveau post-traductionnel et notamment par phosphorylation. Bim et Mcl-1 seront pris comme exemple. Bim peut être phosphorylé par ERK ce qui inhibe l'interaction avec Mcl-1 et Bcl-xL et induit la dégradation de la protéine (Ewings et al., 2007). La perte de cette phosphorylation est nécessaire à l'induction du processus apoptotique par Bim. Comme décrit plus haut, cette voie est d'ailleurs impliquée dans la résistance à l'anoikis (Reginato et al., 2003) (Collins et al., 2005). Mcl-1 est aussi une cible de ERK. Cette phosphorylation inhibe la dégradation de Mcl-1. Cela explique que l'utilisation d'un inhibiteur de ERK augmente la mort induite par un arrêt en mitose (Kawabata et al., 2012). Diverses voies modulent la phosphorylation de Mcl-1. Alors que CDK1 intervient en mitose, de nombreuses autres kinases modulent la stabilité de ces protéines en interphase. Mcl-1 est aussi la cible de GSK3 β qui la phosphoryle sur son résidu sérine 159 (Maurer, Charvet, Wagman, Dejardin, & Green, 2006) (Ren et al., 2013) (Maurer et al., 2014). Ainsi marquées, les E3 ligases FBW7 (F-box/WD repeat-containing protein 7) et β TrCP(beta transducin-containing protein) induisent sa dégradation (Inuzuka, Shaik, et al., 2011b) (Inuzuka, Fukushima, et al., 2011a). Dans les cancers, FBW7 est souvent inactivée (L. Wang, Ye, Liu, Wei, & Wang, 2014a). De plus, l'activation de la voie PI3K/AKT, par des mutations de PTEN ou de PI3K, inhibe la phosphorylation de Mcl-1 par

GSK3 β . Ces mutations favorisent la survie cellulaire et marquent une dépendance oncogénique aux protéines anti-apoptotiques.

La balance protéines anti-apoptotiques/ BH3 seul module la réponse au traitement.

La régulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et de leur stabilité joue un rôle essentiel dans la modulation de l'apoptose induite par la chimiothérapie. Les protéines anti-apoptotiques sont souvent sur-exprimées par les voies oncogéniques activées dans les cellules cancéreuses favorisant une résistance intrinsèque. Lors d'un traitement génotoxique, l'équilibre entre protéines de survie et protéines activant l'apoptose est donc modifié. Suite à l'activation des différents points de contrôle décrits précédemment, p53 favorise en effet l'induction de l'expression de Bax, Bad, Noxa et Puma alors que CDK1 inhibe l'activité de Mcl-1 et Bcl-xL. Cependant, en fonction des altérations oncogéniques inactivant les voies de réponse au traitement, les tumeurs ont des sensibilités différentes au processus apoptotique en raison de leur faible capacité à induire les protéines à domaine BH3 seul ou en raison de la sur-expression de protéines de survie. De plus, l'hétérogénéité intra-tumorale définie comme la présence de plusieurs clones tumoraux, pouvant avoir des panels d'altérations différents, est certainement responsable d'une différence de sensibilité à l'apoptose au sein d'une même tumeur. La caractérisation du lien entre certaines altérations génétiques et la sensibilité des cellules tumorales au processus apoptotique permet d'identifier des cibles pour des futures thérapies. Le génotypage des tumeurs pourrait alors permettre de prédire leur capacité à induire l'apoptose pour un traitement donné et de proposer la meilleure combinaison pour parvenir à l'induction de ce mécanisme radical de mort cellulaire.

Lorsque les cellules ne sont pas sensibles à l'apoptose, en raison de la sur-expression de protéines de survie par exemple, elles peuvent entrer en sénescence qui constitue une autre forme de suppression tumorale (Vitale et al., 2011). Le prochain chapitre est consacré à la présentation des différents aspects caractérisant la sénescence. En plus de la régulation de l'expression des protéines de survie, d'autres voies de signalisation seront identifiées comme déterminantes dans le choix entre apoptose et sénescence.

1.2.2.4.2. La Sénescence.

Caractéristiques générales de la sénescence.

La sénescence se caractérise principalement par une sortie définitive du cycle cellulaire et par l'activation des voies p53/p21 et p16/pRb. Elle est donc remise en cause lorsque ces voies sont inactivées, par exemple lors du processus de cancérogenèse (Beauséjour et al., 2003). Un des marqueurs les plus utilisés de la sénescence est l'activité de la SA- β -galactosidase («Senescence Associated β -galactosidase»). Cette enzyme est présente dans les vésicules lysosomiales, augmentées lors du processus de sénescence. Elle n'a pas de rôle direct dans la mise en place du processus, elle est plutôt une conséquence (B. Y. Lee et al., 2006). Au niveau morphologique, une augmentation de la taille de la cellule, de sa granularité interne et l'apparition de foci d'hétérochromatine (SAHF ou «Senescence-associated heterochromatin foci») sont recensés (Kuilman, Michaloglou, Mooi, & Peeper, 2010). Alors que les gènes de prolifération sont mis sous silence, au sein de ces structures compactées contenant entre autres des répresseurs transcriptionnels, d'autres gènes codant pour des protéines sécrétées sont activement exprimés. Ainsi la sécrétion de protéines pro-inflammatoires est une autre caractéristique de la sénescence (P. D. Adams, 2009) (Rodier & Campisi, 2011). Ces protéines font parties du SASP («Senescence Associated Secretory Phenotype»). La sénescence peut être considérée comme une intense réorganisation de l'expression des gènes (Lanigan, Geraghty, & Bracken, 2011). Les voies p53/p21 et p16 y contribuent pour inhiber les gènes prolifératifs via les protéines pRb (protéine du Rétinoblastome) qui permettent la formation des SAHF.

Différents types de sénescence.

Le processus de sénescence a été découvert dans le cadre du vieillissement des cellules. Il a été associé à la limite de Hayflick. Chaque cellule possède un nombre de division limité en raison du raccourcissement des télomères intervenant à chaque division. Lorsque cette limite est atteinte les télomères détériorés sont considérés comme des dommages d'ADN double-brin et ils induisent la DDR. Ce type de sénescence a été qualifié de réplcatif. La sénescence qui intervient à la suite d'un traitement de chimiothérapie ou suite à l'activation d'oncogènes (OIS ou «Oncogene Induced Senescence») est appelée sénescence cellulaire ou sénescence prématurée (Kuilman et al., 2010). Cette sénescence résulte de l'accumulation de dommages de l'ADN non réparés qui sont la cause d'une activation constante de la DDR. La voie exacte que suivent les cellules pour arriver au phénotype de sénescence dépend beaucoup du moment du cycle ou les dommages sont détectés et de l'inducteur de la sénescence.

Contexte d'activation de la sénescence.

Alors que le devenir des cellules suite au traitement par des poisons du fuseau mitotique est bien documenté, très peu d'études décrivent le devenir exact des cellules suite au traitement induisant des dommages de l'ADN avant la mitose. L'activation du point de contrôle G2/M est connue, mais lorsque ce point de contrôle est abrogé, l'entrée des cellules en mitose et les conditions exactes d'induction de la sénescence sont hypothétiques. Contrairement aux poisons du fuseau, les traitements par la doxorubicine ou l'étoposide ne semblent pas associés à un arrêt en mitose (Chu et al., 2012). Suite à l'irradiation des cellules, un arrêt en phase G2 est observé. Cet arrêt est suivi de la dégradation des protéines essentielles à la transition G2/M comme la cycline B, Aurora A, PLK1 et l'induction de la cycline D (C. Ye et al., 2013). Cela induirait un saut de mitose («mitotic skipping»). Contrairement à une sortie de mitose («mitotic slippage») qui intervient lors de la catastrophe mitotique, le saut de mitose implique que les cellules ne sont jamais entrées en mitose. Une autre étude aborde cette notion. La sénescence pourrait en effet dépendre d'un saut de la mitose médié par l'activation de p53 en G2 (Johmura et al., 2014). Grâce à l'activation transcriptionnelle de p21, cette voie permettrait d'inactiver prématurément le complexe cyclineB/CDK1 et d'échapper au processus mitotique. Même si leurs conditions d'activation diffèrent, le saut ou la sortie de mitose dépendent majoritairement de p53 (Johmura et al., 2014) (Blagosklonny, 2007). Les cellules sénescents pourraient donc être des cellules tétraploïdes bloquées en phase G1 ayant échappées au processus mitotique. Dans tous les cas, les voies p53/p21 et p16/pRb apparaissent respectivement essentielles à l'induction et au maintien de la sénescence.

La voie p53/p21 est activée de façon précoce.

La sénescence médiée par p53 est majoritairement dépendante de p21. Lors de la sénescence induite par la doxorubicine, le pourcentage de cellules ayant activées la SA- β -galactosidase est comparé entre les cellules HCT116 sauvages, n'exprimant pas p53 (HCT116 p53^{-/-}) et n'exprimant pas p21 (HCT116 p21^{-/-}) (Chang et al., 1999). Les résultats montrent que l'activité de cette enzyme, marquant la sénescence, est dépendante de l'expression de p53 et p21. Dans des lignées TP53 déficientes, la sénescence peut être restaurée par la transfection de p53 mais également simplement par celle de p21. La seule sur-expression de ce dernier permet d'induire la sénescence en absence d'activation de p53 (Sugrue, Shin, Lee, & Aaronson, 1997) (Fang et al., 1999). Ces études montrent donc que la sénescence prématurée induite par la chimiothérapie est dépendante de l'induction de la voie p53/p21 et suggère qu'elle est majoritairement dépendante de l'induction de p21. p21 exerce ses fonctions de diverses manières lors de la sénescence. Cet inhibiteur des complexes cycline CDK participe à la répression de

l'activité transcriptionnelle des protéines E2F et notamment d'E2F1 (Wunderlich & Berberich, 2002). Via l'activation des protéines pRb, p21 réprime la transcription des gènes cibles de ces facteurs E2F1, E2F2 et E2F3. p21 inhibe aussi directement l'expression des gènes prolifératifs comme PLK1, topoisomérase II α , Myc, CDC25A en réponse aux dommages de l'ADN (Chang et al., 2002) (Vigneron, Cherier, Barre, Gamelin, & Coqueret, 2006). Ces différentes fonctions de p21 participent à l'arrêt du cycle cellulaire observé lors de la sénescence (Figure 20). Cependant, l'expression de p21 et de p53 est transitoire en réponse aux dommages de l'ADN induit par l'inhibition de la topoisomérase I (Poele, Okorokov, Jardine, Cummings, & Joel, 2002). p16, induit dans un second temps, serait indispensable au maintien du processus de sénescence.

Exprimé de façon tardive, p16 serait responsable du maintien de la sénescence.

Suite aux dommages, l'expression de p16 pourrait intervenir tardivement par rapport au moment de la génération des dommages de l'ADN. Après l'irradiation de fibroblastes humains normaux, l'expression transcriptionnelle de p16 n'est induite qu'au bout de sept jours dans les cellules tétraploïdes (Johmura et al., 2014). Peu d'études s'intéressent à des temps aussi longs. L'expression des gènes p16INK4a et p14ARF, situés sur le même locus, est inhibée par la présence constitutive de protéines de remodelage de la chromatine sur leurs promoteurs. Les protéines Polycomb, complexes de répression transcriptionnelle, sont recrutées par la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), sur le locus INKAa/ARF. Cette tri-méthylation est induite par EZH2. Un des mécanismes participant au détachement des complexes des Polycomb, et donc à l'induction de p16, impliquerait une perte de l'expression de EZH2. Le gène codant pour cette protéine est la cible des protéines E2F1 E2F2 et E2F3 et est essentiel à la prolifération (Bracken et al., 2003). Lors du processus de sénescence, le complexe répresseur 2 des Polycomb, contenant EZH2, se détache du locus INKAa/ARF et autorise la transcription (Bracken et al., 2007). L'activation de p53 puis l'accumulation de p21 inhibe l'activité des complexes cycline/CDK. Cela conduit à la perte de la phosphorylation des protéines pRb qui recrutent des complexes répresseurs de la transcription sur les gènes cibles des protéines E2F1, E2F2 et E2F3. La diminution de l'expression de EZH2 est donc une conséquence de la perte d'activité des protéines E2F, elle induit la dé-répression du locus INKAa/ARF en réponse aux dommages de l'ADN (Figure 20). p16 est un inhibiteur du complexe cyclineD/CDK4 qui agit en phase G1. p16 inhibe donc de façon indirecte l'expression des gènes cibles d'E2F via les protéines pRb. Il y a donc une boucle d'amplification de l'expression de p16 (Figure 20). p16 ne serait donc pas nécessaire à l'induction du processus de sénescence, mais il serait essentiel au maintien de ce phénotype (Beauséjour et al., 2003) (Kosar et al., 2011) (Johmura et al., 2014).

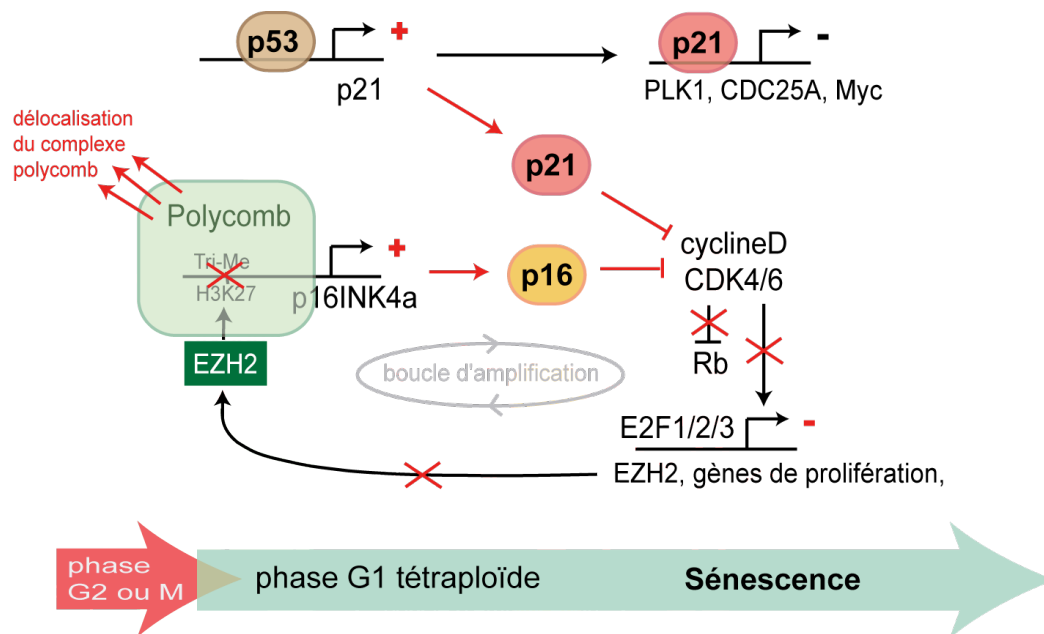


Figure 20 : La voie p53/p21 induit la sénescence et celle de p16 maintient le phénotype. La protéine p53 est activée à la sortie de mitose et active l'expression de p21. Cet inhibiteur de cycline/CDK bloque directement l'expression de PLK1, CDC25A et Myc. D'autre part p21 déclenche une boucle d'amplification de la sénescence (en rouge). En effet, il réprime indirectement l'expression des gènes cibles des protéines E2F1, E2F2 et E2F3. Parmi eux, EZH2 est responsable de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 sur le promoteur de p16INK4a, cette marque épigénétique permet le recrutement des complexes répresseurs Polycomb. Grâce à p21, le blocage de la transcription d'EZH2, et donc la perte de la méthylation et la délocalisation des Polycomb, libère le promoteur de p16INK4a et autorise la transcription. L'expression de p16 renforce le blocage du complexe cyclineD/CDK4/6 et donc la dé-répression de son promoteur. Cela verrouille l'arrêt du cycle cellulaire et maintient le processus de sénescence chez les cellules tétraploïdes.

Les protéines pRb contrôlent la compaction de la chromatine.

La sénescence est associée à une modification de la structure de la chromatine avec l'apparition de zones très compactées appelées SAHF («Senescence-associated heterochromatin foci») (Sulli, Di Micco, & d'Adda di Fagagna, 2012). Ces zones sont riches en protéines de remodelage de la chromatine comme HP1, les histones déacétylases (HDAC) et la méthyltransférase Suv39H1. Les modifications épigénétiques telles que l'hypo-acétylation des histones, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, introduites par ces protéines sont responsables de la compaction et donc de l'inhibition de la transcription. Lors de la sénescence, ce sont les protéines pRb qui recrutent ces protéines de remodelage au niveau des gènes cibles d'E2F, gènes impliqués dans la prolifération (Narita et al., 2003). Les protéines E2F ne sont donc plus capables d'induire l'expression de leurs gènes cibles. La présence de SAHF n'est pourtant pas toujours retrouvée lors du processus de sénescence (Kosar et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs s'intéressent à la sénescence induite par différents types de stress dans des fibroblastes et des kératinocytes primaires humains. 12 jours après l'induction du stress,

ils regardent le pourcentage de cellules contenant des SAFH. Alors que l'expression de H-RasV12 induit la formation de SAFH dans 70% environ des cellules de chaque type, le traitement par l'étoposide ou la doxorubicine induit la formation de SAFH uniquement dans les fibroblastes MRC-5 et à des pourcentages plus faibles que pour H-RasV12. Les cellules dépourvues de SAFH présentent tout de même un phénotype de sénescence. Cette capacité à former les SAFH est corrélée à la capacité à induire l'expression de p16 qui est dépendante de chaque type cellulaire (Kosar et al., 2011). En réponse au traitement, la présence de SAFH ne semble donc pas indispensable à l'induction de la sénescence mais, comme p16, elle pourrait garantir la maintien du phénotype.

L'expression de protéines associées au phénotype de sénescence : le SASP.

Dans une étude de l'équipe de Igor Roninson, le profil transcriptomique de gènes dérégulés lors du processus de sénescence suite à la doxorubicine a été comparé entre les cellules HCT116, HCT116 p21^{-/-} et HCT116 p53^{-/-} (Chang et al., 2002). Les auteurs montrent que de nombreux gènes codant pour des protéines sécrétées sont induits lors de la sénescence. L'équipe de Judith Campisi a montré que ces facteurs sont sécrétés en réponse à divers stress génotoxiques comme une irradiation ou un traitement par le mitoxantrone, utilisé en chimiothérapie, in vitro et in vivo (Coppé et al., 2008). En effet, des cellules issues de tumeurs de la prostate ont été prélevées avant et après une chimiothérapie néo-adjuvante. L'IL6 et GRO- α sont par exemple sur-exprimés après la chimiothérapie dans les tumeurs (Coppé et al., 2008). L'état de sénescence d'une cellule ne se résume donc pas uniquement à l'arrêt de la division cellulaire. Le processus est en effet associé à la sécrétion d'une grande quantité de protéines qui influencent le micro-environnement (Tableau 1). Elles sont impliquées dans la suppression tumorale, la promotion tumorale, le vieillissement et la réparation tissulaire (Rodier & Campisi, 2011).

EGF : «Epidermal Growth Factor»
GM-CSF : «Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor»
GRO α : «Growth-Related Oncogene alpha»
HGF : «Hepatocyte Growth Factor»
IGFBP7 : «Insulin-like Growth Factor Binding Protein-7»
TGF- β : «Transforming Growth Factor-Beta»
IL1- α : Interleukine 1 alpha
IL1- β : Interleukine 1 beta
IL6 : Interleukine 6
IL8 : Interleukine 8
MCPs : «Monocyte Chemoattractant Proteins»
MMP1, 3, 10, 12, 13, 14 : Métallo Protéases Matricielles
PAI-1 : «Plasminogen Activator Inhibitor-1»
VEGF : «Vascular Endothelial Growth Factor»

Tableau 1 : Exemples de protéine sécrétées lors du processus de sénescence (Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010a).

Au cours de la mise en place de la sénescence suite à une irradiation, l'expression de ce SASP serait activée par les foci persistants de dommages de l'ADN et de façon dépendante des protéines ATM et Chk2 (Rodier et al., 2009). La signalisation des dommages de l'ADN, en réponse à l'activation d'un oncogène ou au traitement par l'étoposide, induirait l'activation de p65, un membre de la famille NFκ-B (Chien et al., 2011) (Figure 21). p65 régulerait directement l'expression de nombreux facteurs du SASP. Les auteurs montrent qu'un shRNA dirigé contre p65 abolit l'expression de l'IL1-α et l'IL6. L'IL1-α serait une des premières protéines sécrétées. Cette interleukine régule l'inflammation, la réponse immunitaire et permet l'expression de l'IL6 et l'IL8 en activant la fonction transcriptionnelle de NFκ-B et C/EBPβ (Orjalo, Bhaumik, Gengler, Scott, & Campisi, 2009). En se fixant à son récepteur IL1-R, IL1-α ferait partie d'une boucle d'amplification autocrine nécessaire à la sécrétion du SASP (Figure 21). Dans une étude intéressante, p38MAPK apparaît aussi comme essentiel à la sécrétion du SASP suite à une irradiation (Freund, Patil, & Campisi, 2011). La sécrétion de protéines comme l'IL6, IL8, GM-CSF est abolie lors de l'utilisation d'un shRNA dirigé contre p38MAPK ou du SB203580, un inhibiteur de cette kinase. La régulation du SASP par cette kinase, activée suite au stress génotoxique, serait elle aussi dépendante de p65.

Le SASP est spécifique d'un tissu, d'un contexte cellulaire. Il peut agir de façon autocrine et paracrine et a un rôle de suppression ou de promotion tumorale.

SASP et propagation du phénotype de sénescence.

La suppression tumorale médiée par le SASP s'exerce de plusieurs manières. De manière autocrine, d'une part, le SASP permet de renforcer l'état de sénescence des cellules qui le sécrètent. D'autre part, le SASP peut agir de manière paracrine en propageant le signal de sénescence aux cellules épithéliales environnantes et aux cellules stromales. Les effets du SASP sont médiés notamment par l'IL1-α, qui contrôle lui-même l'expression du SASP, et par le TGF-β, qui active l'expression de p15 et p21 (Acosta et al., 2013) (Figure 21). Une autre étude met en cause l'IGFBP7 dans la propagation et le maintien de la sénescence suite à l'OIS (Wajapeyee, Serra, Zhu, Mahalingam, & Green, 2008) (Chien & Lowe, 2008). IGFBP7 inhiberait la voie B-Raf-MEK-ERK. De plus, l'inflammation induite par le SASP permet le recrutement de cellules immunitaires qui vont assurer l'élimination des cellules sénescents. Diverses chemokines, sécrétées par les cellules sénescents, activent par exemple les cellules NK. Ces dernières expriment alors le récepteur NKG2D. Les ligands de NKG2D sont sécrétés par les cellules sénescents et l'activation de cette voie induit la production d'une molécule cytotoxique, l'interféron γ. L'inflammation ainsi que la sécrétion de MMPs («matrix metalloprotéinases») ont pour but premier de maintenir

l'intégrité du tissu et de restaurer ses fonctions normales notamment en limitant la fibrose (Krizhanovsky et al., 2008) (Campisi, 2011). Dans des conditions normales, le SASP a des rôles positifs mais, lorsque cette inflammation devient chronique, il peut avoir un effet délétère et finalement altérer le tissu et sa fonction (Freund, Orjalo, Desprez, & Campisi, 2010). Son effet peut alors basculer vers le côté pro-tumorigénique (Krtolica, Parrinello, Lockett, Desprez, & Campisi, 2001) (Rodier & Campisi, 2011) (Terzić, Grivnickov, Karin, & Karin, 2010).

SASP, promotion tumorale et chimiorésistance.

Les protéines sécrétées lors de la sénescence sont également impliquées dans la progression tumorale (Figure 21). Par exemple, le milieu conditionné des cellules sénescents, générées par une irradiation, augmente l'invasion de cellules de cancer du sein de façon dépendante de l'IL6 (Rodier et al., 2009). Dans une autre étude intéressante, le phénotype de sénescence est induit dans des cellules de mesothéliomes avec du pemetrexed. Le milieu conditionné des cellules, contenant de l'IL6, IL8, VEGF-A, INF γ , CXCL1 est associé à l'induction du mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) chez des cellules non traitées (Canino et al., 2011). Les auteurs observent aussi un enrichissement des cellules ayant une activité ALDH élevée, caractéristique des cellules dé-différenciées. L'étude de l'équipe de Brigitte Sola va aussi dans ce sens. Dans le myélome multiple, l'émergence de cellules CD138^{low}, ressemblant à des cellules souches cancéreuses, est observée de façon dépendante du SASP suite au traitement par la doxorubicine (Cahu, Bustany, & Sola, 2012). Dans ces études, le SASP apparaît donc comme associé à la chimiorésistance. Suite à la sénescence induite par la doxorubicine, de nombreux ligands de Wnt feraient aussi partie du SASP, entraînant l'activation de la β -caténine (Basu, Reyes-Mugica, & Rebbaa, 2012). L'induction de l'EMT par le SASP est aussi observée, comme l'attestent l'induction de l'expression de Zeb1, de Twist et de la vimentine et la perte de l'expression de l'E-cadhérine. En réponse aux dommages induits par la chimiothérapie, le SASP a donc clairement un rôle dans la progression tumorale.

Lors de l'oncogenèse, le SASP pourrait aussi jouer un rôle essentiel dans la progression des polypes intestinaux vers des lésions cancéreuses en induisant l'échappement à la sénescence oncogénique (Pribluda et al., 2013). Ainsi, l'utilisation d'agents anti-inflammatoires non stéroïdien (NSAID) pourrait inhiber la progression des cancers colorectaux (Pribluda et al., 2013). Toutes ces études tendent à montrer que les membres du SASP ont un rôle beaucoup plus large que la régulation de la sénescence. Ils sont associés à la progression tumorale et à la chimiorésistance en favorisant le processus

d'EMT, l'émergence de cellules peu différenciées et plus invasives. Comme le proposent certaines études, de nouvelles stratégies de traitements doivent être étudiées pour limiter l'expression du SASP ou agir en aval de façon à améliorer la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Cette approche semble facilitée par le fait que les facteurs du SASP possèdent des récepteurs dont l'activité peut être inhibée.

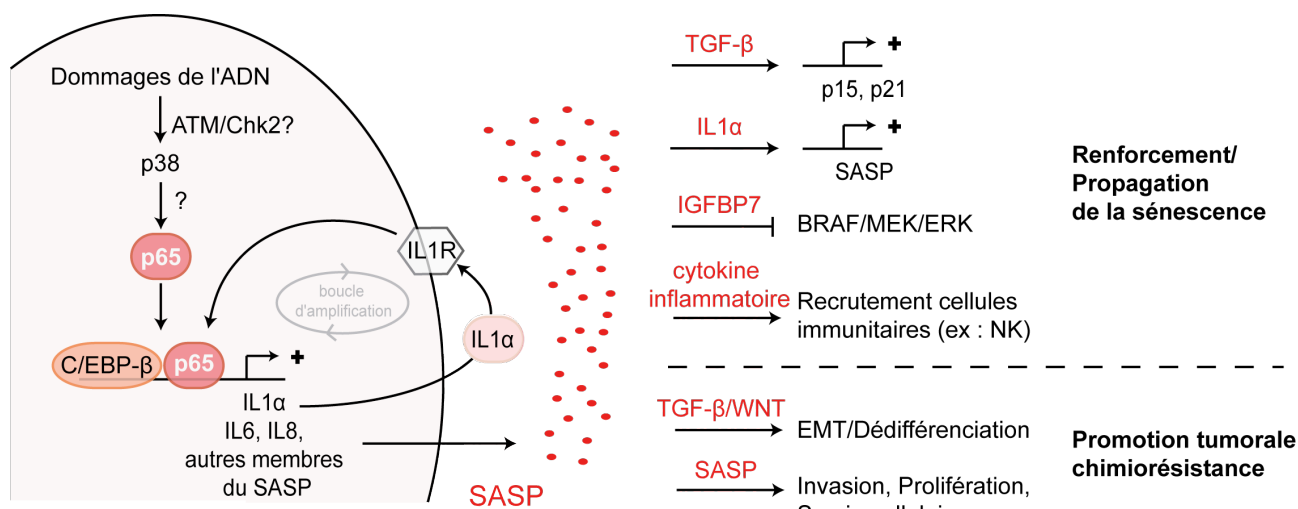


Figure 21 : Le SASP a une action pro ou anti-tumorale. Lors de l'activation de la sénescence, un grand nombre de protéines sont sécrétées. En réponse aux dommages de l'ADN, l'activation de l'expression de ces protéines dépendrait de p38, p65 et C/EBP-β. La sécrétion de l'IL1α serait nécessaire à l'amplification de l'expression du SASP. De façon autocrine ou paracrine, les protéines composant le SASP ont des actions favorisant la sénescence et/ou la chimiorésistance.

Le processus de sénescence est donc induit par les dommages de l'ADN de façon dépendante de la voie p53/p21. Activée dans un second temps, la voie p16/pRb participe à la formation de SAFH et au blocage irrémédiable de la transcription de certains gènes prolifératifs. Ce processus est limité par l'inactivation des voies p53/p21 et p16/pRb. Par définition, les cellules cancéreuses ont échappé à l'OIS («Oncogene Induced Senescence») au cours de l'oncogenèse. Ces cellules peuvent donc, par des mécanismes similaires, échapper à la sénescence induite par les traitements chimiothérapeutiques. De plus, le SASP est largement associé à la progression tumorale. La sénescence est donc un mécanisme de réponse à la chimiothérapie qui ne doit pas être considéré comme satisfaisant. Des stratégies thérapeutiques limitant le SASP peuvent être étudiées. Mais le but des traitements doit être l'induction du mécanisme le plus radical, l'apoptose. Pour cela il faut bien comprendre les mécanismes régissant le choix entre apoptose et sénescence. p53 est activée suite aux dommages de l'ADN. Son rôle précis dans le choix du type de mort cellulaire dépend du contexte.

1.2.2.4.3. Le dilemme apoptose/sénescence, p53 au centre du débat.

La voie E2F/ASPP maintient la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose.

Les protéines E2F (E2F1, E2F2, E2F3) régulent l'expression de nombreux gènes. Outre les gènes prolifératifs de la phase S/G2, elles induisent aussi des gènes impliqués dans l'apoptose de façons directe et indirecte. E2F1 active en effet l'expression de gènes codant pour les protéines à domaine BH3 seul Puma, Noxa et Bim. De plus, les facteurs de transcription E2F activent l'expression des protéines ASPP («apoptosis stimulating proteins of p53»), ASPP1 et ASPP2. Ces protéines modifient l'affinité de p53 pour l'ADN et augmentent sa capacité à induire le gène Bax (Slee & Lu, 2003). En revanche, elles n'interviendraient pas dans la transcription de p21 (D. Chen, Padiernos, Ding, Lossos, & Lopez, 2004) (Hershko, Chaussepied, Oren, & Ginsberg, 2005) (Sullivan & Lu, 2007). Les protéines ASPP activent donc l'apoptose via p53. Suite aux dommages de l'ADN, lorsque les protéines E2F ne sont pas réprimées, elles induisent des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose (Figure 22). Cependant, l'activité transcriptionnelle des protéines E2F est inhibée par la voie p53/p21/pRb.

Le frein du cycle cellulaire : la voie p21/pRb réprime les gènes cibles d'E2F et favorise la survie.

Grâce à son rôle d'inhibiteur des complexes cycline/CDK, p21 bloque le cycle cellulaire en réprimant les gènes cibles d'E2F via la protéine pRb. Suite aux dommages de l'ADN, p21 réprime aussi directement les gènes codant pour CDC25A et PLK1 par exemple. Cela participe au ralentissement, voire à l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S mais aussi en G2/M. p21 est également responsable de l'inhibition du processus apoptotique. Via le blocage de E2F par pRb, p21 réprime indirectement les protéines pro-apoptotiques comme Puma, Noxa, Bim, ASPP1 et ASPP2. Cette fonction anti-apoptotique n'est pas uniquement dépendante de la protéine pRb. Lorsqu'il est cytoplasmique, p21 inhibe l'activité des kinases de stress SAPK/JNK via son interaction avec ASK1 (Asada et al., 1999) (Shim, Lee, Park, Kim, & Choi, 1996). De plus p21 interagit avec la procaspase 3 et inhibe son activation (Suzuki, Tsutomi, Akahane, Araki, & Miura, 1998). L'équipe de Roelof Koster montre que p21, localisé dans le cytoplasme, est ainsi responsable de la résistance à l'apoptose induite par l'oxaliplatine dans les cellules de cancers des testicules (Koster et al., 2010). La rétention cytoplasmique de p21 dépendrait alors de sa phosphorylation par la kinase AKT. En ralentissant le cycle cellulaire et en bloquant l'induction de l'apoptose, les fonctions de p21 sont donc antagonistes de celles des protéines E2F (Figure 22).

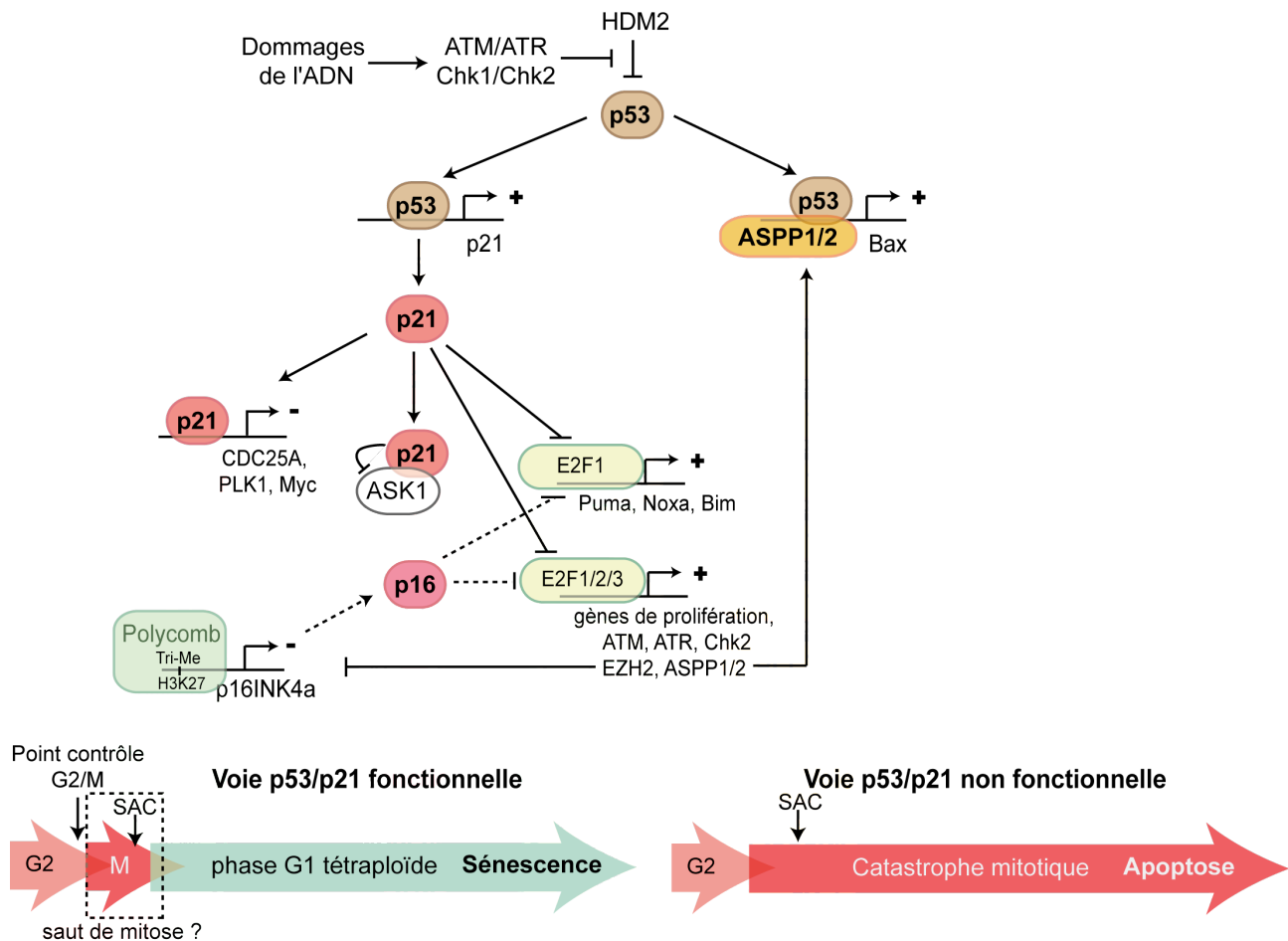


Figure 22 : La fonctionnalité de la voie p53/p21 est au coeur de la décision entre sénescence et apoptose. Lorsque cette voie est fonctionnelle, p53 active l'expression de p21 en réponse aux dommages de l'ADN. p21 bloque la prolifération directement en réprimant la transcription de CDC25A, PLK1 et Myc et indirectement en réprimant celle des gènes cibles d'E2F1/2/3. p21 inhibe également l'apoptose, d'une part en bloquant l'activité de la kinase de stress ASK1 et d'autre part en inhibant indirectement la transcription de Puma, Noxa, Bim et ASPP1/2, des gènes cibles des protéines E2F1/2/3. De plus p21 participe à l'activation de l'expression de p16. En résumé, p21 favorise l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition du processus apoptotique. Lorsque la voie p53/p21 n'est pas activée, les gènes de prolifération, et notamment les gènes cibles des protéines E2F1/2/3, ne sont pas réprimés. Le point de contrôle G2/M est alors inactif. De plus, les protéines E2F1/2/3 peuvent aussi favoriser le processus apoptotique en activant directement l'expression des protéines BH3 et indirectement celle de Bax via ASPP1/2. Les cellules entrent alors en mitose en étant déjà sensibilisée au processus apoptotique. Il est donc probable que ces cellules, dont la voie p53/p21 n'est pas fonctionnelle meurent en mitose.

L'activation de p53 au coeur de la décision : arrêter le cycle pour éviter la mort cellulaire.

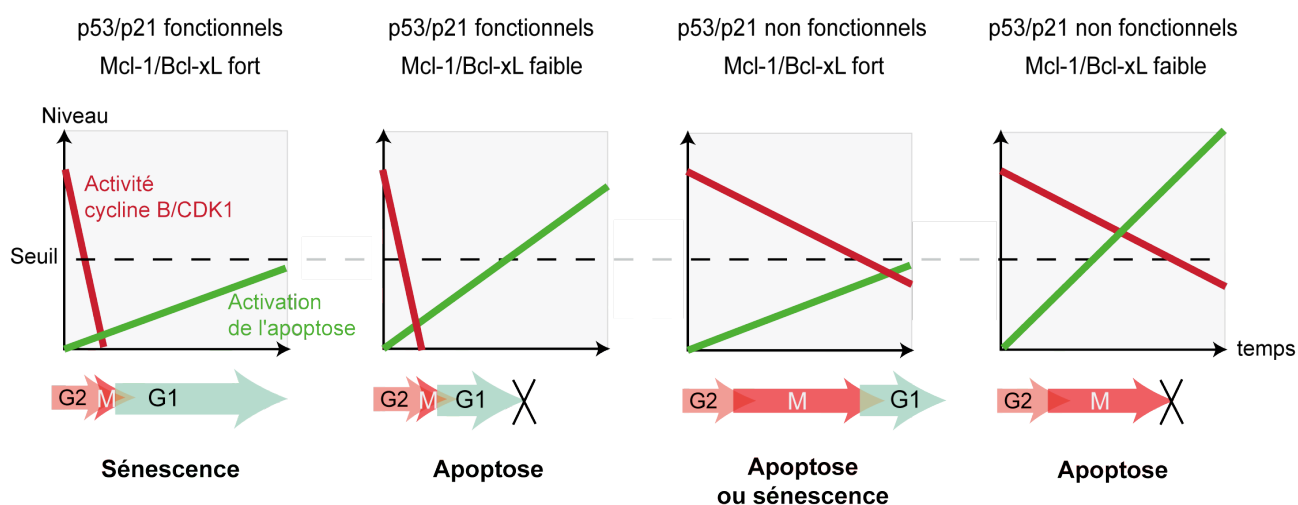
La réponse aux dommages de l'ADN dépend donc beaucoup de la vitesse d'inactivation des protéines E2F et de l'activation et de l'intégrité de la voie p53-p21 (Figure 22). Au cours de la réponse aux dommages de l'ADN, l'induction de p53 favorise l'induction de la sénescence. En effet, dans le cancer colorectal, le traitement par la camptothécine induit l'apoptose chez des cellules dont le gène TP53 est muté alors que la sénescence est observée chez des cellules ayant une version sauvage du gène (Han et al., 2002). Cela

s'explique par l'absence de répression des gènes E2F dans les cellules ayant une version muté du gène TP53, donc ne pouvant pas activer l'expression de p21. En plus d'activer l'expression de protéines à domaine BH3 seul via E2F1, ces cellules ne vont pas ralentir leur cycle et vont entrer en mitose. Lors de cette phase, les dommages vont aboutir à la catastrophe mitotique et possiblement à l'apoptose.

En revanche, les cellules ayant une version sauvage du gène TP53 vont s'arrêter avant la mitose. L'inactivation du complexe cycline B/CDK1, par la voie p53-p21 serait alors responsable d'un saut de mitose essentiel à l'induction de la sénescence (Johmura et al., 2014). De plus, en réprimant la transcription des gènes cibles des protéines E2F, la voie p53/p21 réprime indirectement l'expression d'EZH2, la méthylase responsable de la répression du locus INK4a/ARF. L'activation de p21 participe donc à l'expression de p16 (Figure 22). En deuxième vague, p16 renforce l'inhibition transcriptionnelle des gènes cibles des protéines E2F. Cela amplifie les signaux d'arrêt du cycle cellulaire et verrouille le processus de sénescence. De façon imagée, p21 est le frein à pédale du cycle cellulaire et p16/INK4a y est le frein à main. Ce serait la capacité à bloquer l'activité transcriptionnelle des gènes E2F qui déterminerait la décision entre apoptose et sénescence. Lorsqu'il est fonctionnel, p53 active à la fois l'expression des protéines apoptotiques dont Bax, et l'expression de p21. Grâce à son rôle anti-apoptotique et aux rétro-contrôles, l'effet de p21 est dominant (Figure 22). Notons que cette vision est certainement simplifiée car il est probable que d'autres signalisations comme ATM/ATR, p38, ou le SASP modulent ce choix de réponse.

1.2.3. Conclusion : L'hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie doit être étudiée pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'apoptose et la sénescence sont les deux principales réponses à la chimiothérapie. Alors que l'apoptose aboutit à la perméabilisation mitochondriale et à la destruction cellulaire, la sénescence se caractérise par un arrêt définitif du cycle. Les cellules sénescents, contrairement aux cellules apoptotiques, peuvent jouer un rôle à long terme. Qu'il soit pro ou anti-tumoral, le SASP sécrété lors de la sénescence influence les cellules voisines. Les chimiothérapies doivent donc viser l'induction du mécanisme le plus radical, l'apoptose qui peut être induite soit en mitose lors de la catastrophe mitotique, soit pendant la phase G1 qui suit. Les niveaux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 et des protéines à domaine BH3 seul déterminent la sensibilité au processus apoptotique (Figure 23). Au coeur du choix entre apoptose et sénescence, la modulation de l'activation de la voie p53/p21 est également déterminante. En ralentissant le cycle cellulaire et en contrant les signaux pro-apoptotiques, cette voie conduit les cellules vers le phénotype de sénescence après un saut ou une sortie de mitose (Figure 23).



Les paramètres qui influencent l'orientation vers un type de mort cellulaire plutôt qu'un autre dépendent notamment des mutations des suppresseurs de tumeur et des oncogènes. D'une lignée à l'autre, d'une tumeur à une autre, ces mutations varient. Il existe donc une certaine hétérogénéité de réponse au traitement entre les tumeurs. Grâce à un système de vidéo en «time-lapse», l'équipe de Karen Gascoigne a étudié le devenir de chaque cellule d'une lignée en réponse à des drogues anti-mitotiques (Gascoigne &

Taylor, 2008). A chaque lignée correspond un profil de réponse qui prend en compte toutes les cellules composant la lignée. Leurs résultats témoignent de la diversité de réponse suite au traitement par des drogues anti-mitotiques, entre lignées et au sein d'une même lignée. Par exemple, le traitement par le taxol induit majoritairement la mort en mitose des cellules RKO alors que suite à ce même traitement, la majorité des cellules HCT116 sortent de mitose sans mourir. Mais certaines sous-populations de cellules HCT116 ne suivent pas cette voie majoritaire, certaines n'entrent jamais en mitose, d'autres meurent en mitose et les autres meurent en interphase (Gascoigne & Taylor, 2008). Les auteurs qualifient cette complexité de variation inter et intra lignées. Ils observent aussi que le devenir des cellules n'est pas uniquement déterminé au niveau génétique. Pour cela, il suivent la réponse au traitement de la descendance de trois clones de cellules. La descendance des 3 clones reproduisent exactement le même profil que les cellules parentales, sans enrichissement d'une voie plutôt qu'une autre (Gascoigne & Taylor, 2008). Comme décrit plus haut, le devenir des cellules en mitose dépendrait des vitesses de dégradation de la cycline B et de l'induction des signaux de mort. Entre lignées ces vitesses respectives varient ce qui explique les variations inter lignées observées. De plus, au sein d'une même lignée les seuils peuvent varier entre les cellules ce qui explique les variations intra lignée (Gascoigne & Taylor, 2008).

L'accumulation d'altérations génétiques au cours de la progression cancéreuse conduit à la génération de plusieurs clones localisés à des endroits différents au sein de la masse tumorale (Gerlinger et al., 2012) (Burrell & Swanton, 2014). Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction, chaque clone peut contenir des cellules souches cancéreuses et des cellules différenciées dont la plasticité peut être modulée par le micro-environnement. Différents niveaux d'hétérogénéité intra-tumorale sont donc présents et pourraient être responsables de l'hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie et de l'acquisition de multiples voies de résistance. Le défi des futures thérapies anti-cancéreuses est de s'adapter à cette hétérogénéité pour améliorer la réponse au traitement notamment pour les cancers métastatiques, qui sont très difficiles à traiter. En améliorant notre compréhension des mécanismes de mort cellulaire, nous devrions être capables de prévoir la réponse à la chimiothérapie en fonctions de l'hétérogénéité génétique, épigénétique et phénotypique des tumeurs et du micro-environnement tumoral. La compréhension des mécanismes de résistance aux traitements actuels permettra d'identifier de nouvelles cibles pour les futures thérapies ciblées.

2. BUT DU TRAVAIL

Quels sont les facteurs déterminants de l'échappement à la sénescence en réponse à l'irinotécan : les CSC, l'EMT, Mcl-1, Bcl-xL, p21 ?

Comme nous l'avons vu la sénescence et l'apoptose sont deux mécanismes induits par les traitements génotoxiques. Alors que l'apoptose implique une destruction complète des cellules, la sénescence consiste en l'inactivation de la prolifération. La réponse à la chimiothérapie n'est pas homogène, l'apoptose, la sénescence et l'échappement à la mort cellulaire pourraient être observés en parallèle. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, les tumeurs colorectales sont constituées de clones de cellules cancéreuses qui évoluent différemment au cours de la progression tumorale (Gerlinger et al., 2012). In vitro, cette diversité est aussi observée dans les lignées cellulaires et est responsable d'une diversité de réponse aux anti-mitotiques (Gascoigne & Taylor, 2008).

Le sujet principal du laboratoire concerne les facteurs déterminants, intra-cellulaires ou solubles, de l'échappement à la sénescence qu'elle soit induite par un traitement de chimiothérapie ou par l'expression d'un oncogène (OIS). Notre équipe s'est notamment beaucoup intéressée au rôle de Myc et de p21 dans la réponse aux dommages de l'ADN. L'activation de l'expression de Myc, via la voie src/STAT3 est responsable de l'échappement à la sénescence en réponse à l'adriamycine et de l'augmentation des capacités de croissance en faible adhérence (Vigneron, 2005). En inactivant la transcription de p21, l'oncogène Myc bloque l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence. Ces résultats suggèrent que p21 est essentiel à l'induction de la sénescence. En plus du rôle d'inhibiteur des complexes cycline/CDK, bien décrit dans la littérature, notre équipe a montré que p21 serait requis pour inactiver directement la transcription des gènes prolifératifs Myc et CDC25A, (Vigneron et al., 2006). Myc étant un activateur transcriptionnel d'Aurora A, impliqué dans l'instabilité génétique et la chimiorésistance, son inhibition est nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire (Courapied et al., 2010) (C.-C. Wu et al., 2012). p21 a également des fonctions anti-apoptotiques. Nous pouvons donc nous demander pourquoi l'apoptose n'est pas induite après la perte de p21 chez les cellules ayant activées la voie src/Myc. Dans ces cellules, les auteurs montrent que l'activation de la voie src/Myc est associée à la sur-expression de Bcl-xL. Comme décrit plus haut, cette protéine de la famille de Bcl-2 bloque l'apoptose induite lors de la catastrophe mitotique (Vigneron, 2005). En réponse aux dommages de l'ADN, la voie src/Myc inhibe p21 et active l'expression de Bcl-xL. Ces deux actions conjointes sont responsables de l'échappement à la sénescence et à l'apoptose (Vigneron, 2005). Comme lors de la

réponse à la chimiothérapie, lors de la sénescence induite par l'oncogène Ras (OIS), notre équipe a montré que p21 réprime les gènes prolifératifs dont CDC25A et Plk1 (de Carné Trécesson et al., 2011). L'échappement à l'OIS est associé à la perte de p21 mais aussi à la sur-expression des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL. De plus, de façon intéressante, les cellules ayant échappées à la mort cellulaire, induite par Ras, expriment des marqueurs d'EMT et leur proportion de cellules CD44^{high}/CD24^{low} est augmentée. Ces résultats font écho au rôle de l'EMT et des cellules souches cancéreuses dans l'échappement à la mort cellulaire induite par la chimiothérapie décrits dans la littérature.

Pour poursuivre ces travaux, nous nous sommes intéressés à un modèle d'échappement à la sénescence induite par l'irinotécan dans les cellules colorectales LS174T. Dans ces cellules, nous avons observé l'émergence d'un petit nombre de cellules au milieu d'une majorité de cellules sénescents après l'élimination du traitement. Au cours de la réponse au traitement nous avons aussi constaté une augmentation de la résistance à l'anoikis. Nos expériences ont porté sur l'identification des mécanismes impliqués dans l'émergence des cellules proliférantes et dans la résistance à l'anoikis. Pour faire suite aux travaux du laboratoire, nous nous sommes intéressés aux rôles des CSC, de l'EMT, des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL et de p21 dans la chimiorésistance.

3. RESULTATS

3.1. L'échappement à la sénescence, induite par l'irinotécan, est associé à l'acquisition de la résistance à l'anoikis.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les mécanismes de mort cellulaire induits par l'inhibition de l'ADN topoisomérase I. L'inhibiteur utilisé dans cette étude est le sn38, le métabolite actif de l'irinotécan.

3.1.1. Suite au traitement par l'irinotécan, les mécanismes d'apoptose ou de sénescence sont induits.

Nous avons étudié trois lignées de cellules de cancers colorectaux : HT29, HCT116 et LS174T. Ces trois lignées sont représentatives de ces cancers. Elles présentent, toutes les trois, des mutations activant les voies de la β -caténine (mutations des gènes APC ou CTNNB1), des MAPK (mutations des gènes K-Ras ou B-Raf), de PI3K/AKT (mutations du gène PI3K). En plus de ces mutations, les cellules HCT116 ont des mutations du locus INK4a-ARF. L'inactivation de la transcription de ce locus est fréquente dans les cancers via une méthylation du promoteur. Deux lignées sur les trois ont un phénotype d'instabilité des microsatellites. Les cellules HCT116 ont en effet une mutation sur le gène de réparation MLH1 alors que la cause de ce phénotype chez les LS174T n'est pas connue. Les cellules HT29 présentent d'autres mutations qu'elles ne partagent pas avec les deux autres. Il s'agit des mutations de SMAD4 et de TP53. En réponse à la chimiothérapie, ces mutations peuvent conditionner le type de réponse, notamment celles inactivant TP53 (Han et al., 2002).

Les doses IC50 et IC80 du sn38 des lignées cellulaires HT29, HCT116 et LS174T ont été déterminées. Les cellules dont le gène TP53 est sauvage, HCT116 et LS174T, ont une dose IC50 identique de 0,25ng/mL (Tableau 2). En revanche, celle des cellules HT29, dont le gène TP53 est muté, est environ cinq fois plus forte. Dans une étude pharmacocinétique, les cinq premières heures après l'administration d'irinotécan à raison de 100 à 125mg/m², les concentrations de sn38, mesurées dans le sang des patients, sont entre 20 et 30ng/mL. Cette concentration descend rapidement puis stagne à 5ng/mL 24h environ après l'administration (Chester et al., 2003) (Sato et al., 2013). Nous nous sommes fixés sur cette dose dans nos expériences in vitro. Cette dose correspond à vingt fois l'IC50 des cellules HCT116 et LS174T, et à presque quatre fois celle des cellules HT29 (Tableau 2).

Lignées	sn38 IC50 (ng/mL)	sn38 IC80 (ng/mL)
HT29	1,30	1,75
HCT116	0,25	0,40
LS174T	0,25	0,45

Tableau 2 : IC50 et IC80 du sn38 dans les lignées HT29, HCT116 et LS174T. Des tests de clonogénicité ont été réalisés. Les cellules ont été traitées avec différentes doses de sn38. Les cellules ont été incubées de 7 à 10 jours le temps de la formation des clones. Après avoir été colorés avec du cristal violet, ces clones ont été comptés. Le point non traité a été normalisé à 100% pour chaque lignée. Les moyennes des doses correspondant à 50 et 20% de clonogénicité sont présentées (respectivement IC50 et IC80) (n=3+/-sd).

Lorsque les cellules HT29 sont traitées avec le sn38, le clivage de la caspase 3 est induit (pistes 1 et 3, Figure 24A). D'autre part, le pourcentage de cellules ayant une quantité d'ADN inférieure à 2N, en SubG1, augmente (Figure 24B). Comme ce qui a déjà été montré, ces cellules maintiennent un certain niveau d'expression de la cycline B et de CDK1 au cours du traitement (pistes 2 et 3, Figure 24A) (Bhonde et al., 2005). Il est probable que ces cellules, dont le gène TP53 est muté, subissent la catastrophe mitotique et que l'apoptose soit induite pendant la mitose.

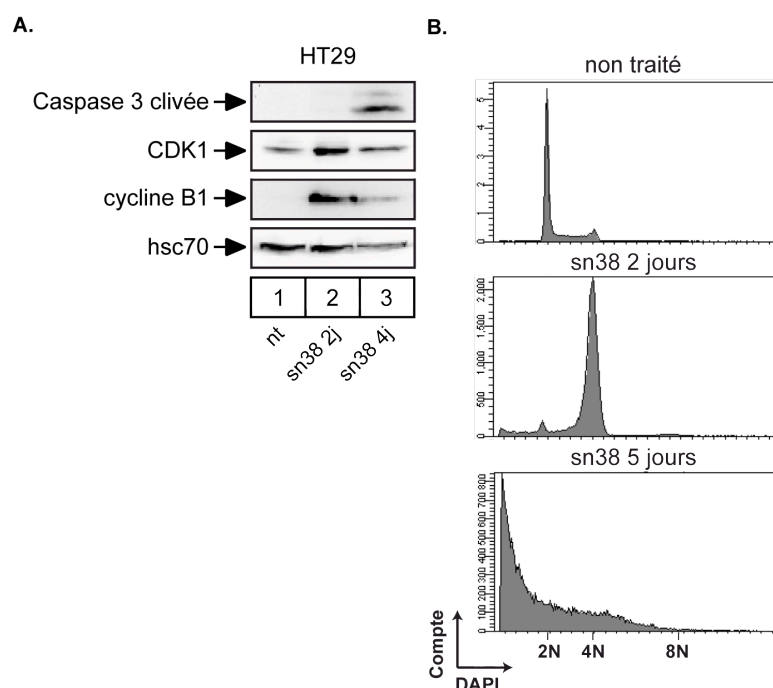


Figure 24 : L'inhibition de l'ADN topoisomérase I induit l'apoptose dans les cellules HT29. **A.** Les cellules ont été traitées avec du sn38 à 5ng/mL pendant le temps indiqué. Le clivage de la caspase 3 et l'expression de la cycline B et de CDK1 ont été recherchés par western blot (n=2). **B.** Des expériences de cytométrie de flux ont été réalisées après le marquage de l'ADN avec du DAPI (n=3).

En revanche, chez les cellules HCT116 et LS174T, dont le gène TP53 est sauvage, le traitement par le sn38 induit l'expression de p21, l'activité de la SA- β -galactosidase, et une augmentation importante de la taille des cellules (Figures 25A, 25B, 26B). Ces marqueurs font partie de ceux caractéristiques de la sénescence. Contrairement aux cellules HT29, suite au traitement, ces deux lignées perdent nettement l'expression de la cycline B et de CDK1 ce qui signifie probablement qu'elles sortent de mitose ou qu'elles sautent cette étape (pistes 2, 3 et 5, 6, Figure 25A). N'ayant pas subies de cytokinèse, les cellules ont majoritairement une quantité d'ADN de 4N, ces cellules sont tétraploïdes (Figure 25C).

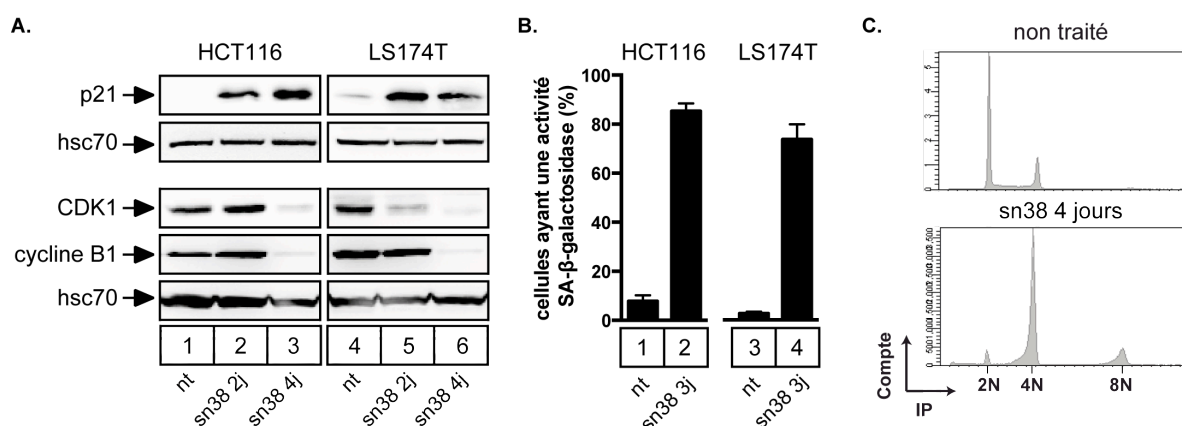


Figure 25 : L'inhibition de l'ADN topoisomérase I induit un phénotype de sénescence dans les cellules HCT116 et LS174T. **A.** Les cellules ont été traitées avec du sn38 à 5ng/mL pendant le temps indiqué. L'expression de p21, de la cycline B et de CDK1 a été recherchée par western blot (n=3). **B.** Le pourcentage de cellules ayant une activité SA- β -galactosidase a été évalué (n=3 +/- sd). **C.** La coloration Vindelov 83 a été réalisée puis analysée par cytométrie de flux (images représentatives de trois expériences).

En réponse au sn38, les lignées colorectales testées expriment des marqueurs d'apoptose ou de sénescence. Alors que le processus de sénescence a été initialement décrit comme définitif, nous nous sommes demandés si des cellules HCT116 et LS174T étaient capables de reprojurer après l'élimination du traitement.

3.1.2. Des cellules échappent à la sénescence induite par le sn38, les cellules persistantes sont composées de cellules proliférantes et sénescents.

Contrairement à ce qui se passe chez le patient, les études in vitro ne reproduisent pas tous les processus de métabolisation et de dégradation du sn38 qui ont lieu entre chaque cure. Pour s'en approcher, suite à l'induction de la sénescence à quatre jours de traitement, le milieu des cellules a été éliminé (Figure 26A). Les cellules ont été rincées avec du PBS puis du nouveau milieu contenant 10% de sérum de veau foetal a été ajouté.

A partir de cinq jours après ce changement de milieu (donc à J9), des cellules reprodifèrent (Figures 26A et 26B). Visuellement, des îlots de petites cellules émergent au milieu de grosses cellules marquées par une activité SA- β -galactosidase (Figure 26B et pistes 2 et 3, Figure 26C). Nous avons qualifié ces cellules de cellules persistantes (PLCs). Cette appellation a été la source de débats puisqu'il fallait trouver un terme qui englobe à la fois les cellules qui reprodifèrent, qui émergent, et celles qui se maintiennent, les cellules sénescences. La sous population de cellules reprodiférantes a été appelée PLD et celle des cellules sénescences PLS.

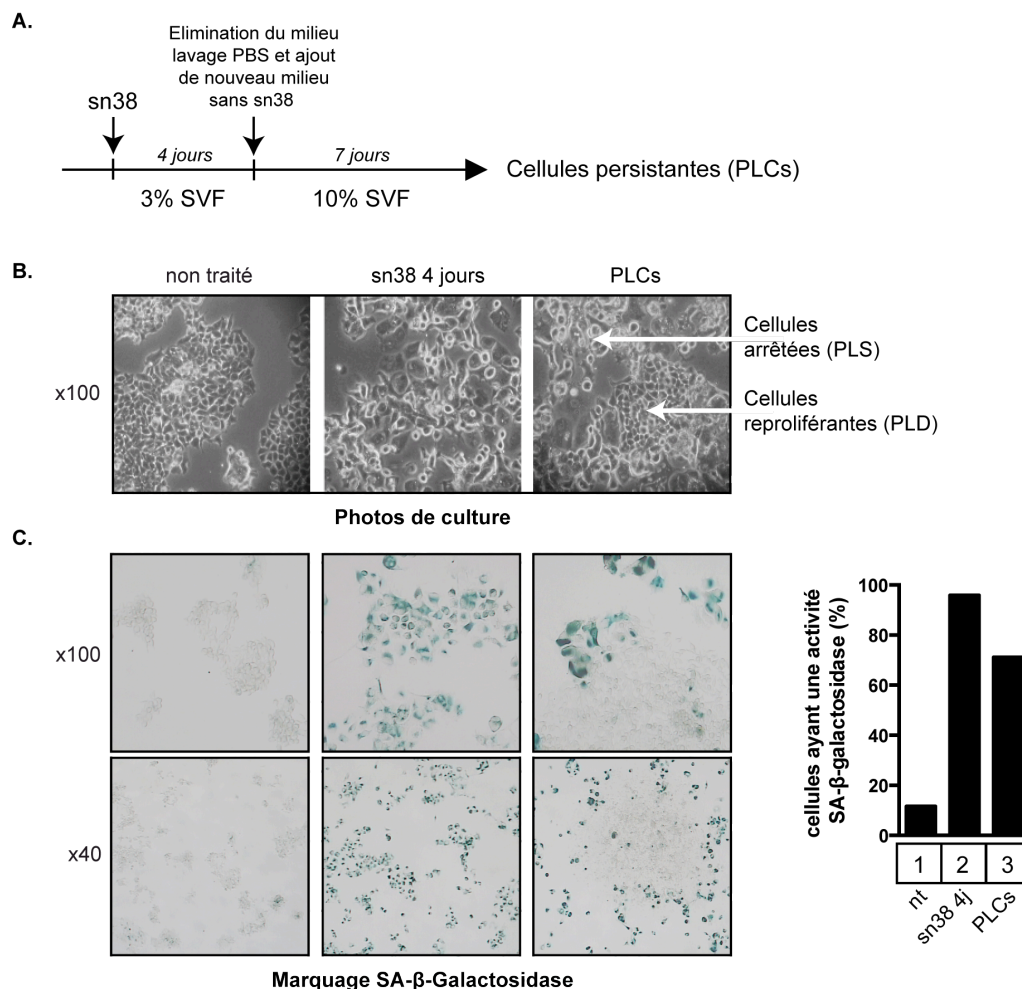


Figure 26 : Echappement à la sénescence induite par le sn38 et génération des cellules persistantes.

A. Schéma expérimental conduisant à la génération de cellules persistantes. Des cellules adhérentes ont été traitées avec du sn38 (5ng/mL) dans du milieu 3% SVF pendant quatre jours. Elles ont ensuite été stimulées avec du nouveau milieu 10% SVF pendant sept jours pour tester leur capacité à reprodiférer. **B.** Photos des différentes conditions pour les cellules LS174T. L'hétérogénéité des cellules LS174T persistantes (PLCs) se traduit par l'apparition d'îlots de petites cellules émergentes au milieu de cellules très larges (le marquage Ki67 est présenté sur le Figure 45) (photos représentatives de quatre expériences). **C.** Marquage de l'activité de la β -galactosidase dans les cellules LS174T non traitées, traitées quatre jours et dans les PLCs. La quantification présentée à droite a été faite à partir d'une expérience représentative parmi quatre.

Nous avons ensuite cherché à quantifier cette émergence. Les photos et la coloration des cellules au cristal violet permettent d'évaluer visuellement le nombre de clones émergents (Figures 27B et 27C). Pour quantifier plus facilement la proportion de cellules émergentes, des tests de clonogénicité ont été réalisés à partir des différentes conditions : non traité, traitement de quatre jours et cellules persistantes (Figure 27D). La même quantité de cellules ayant été déposée, cela permet d'évaluer le pourcentage de cellules proliférantes (PLD) à un temps donné par rapport à la condition non traitée.

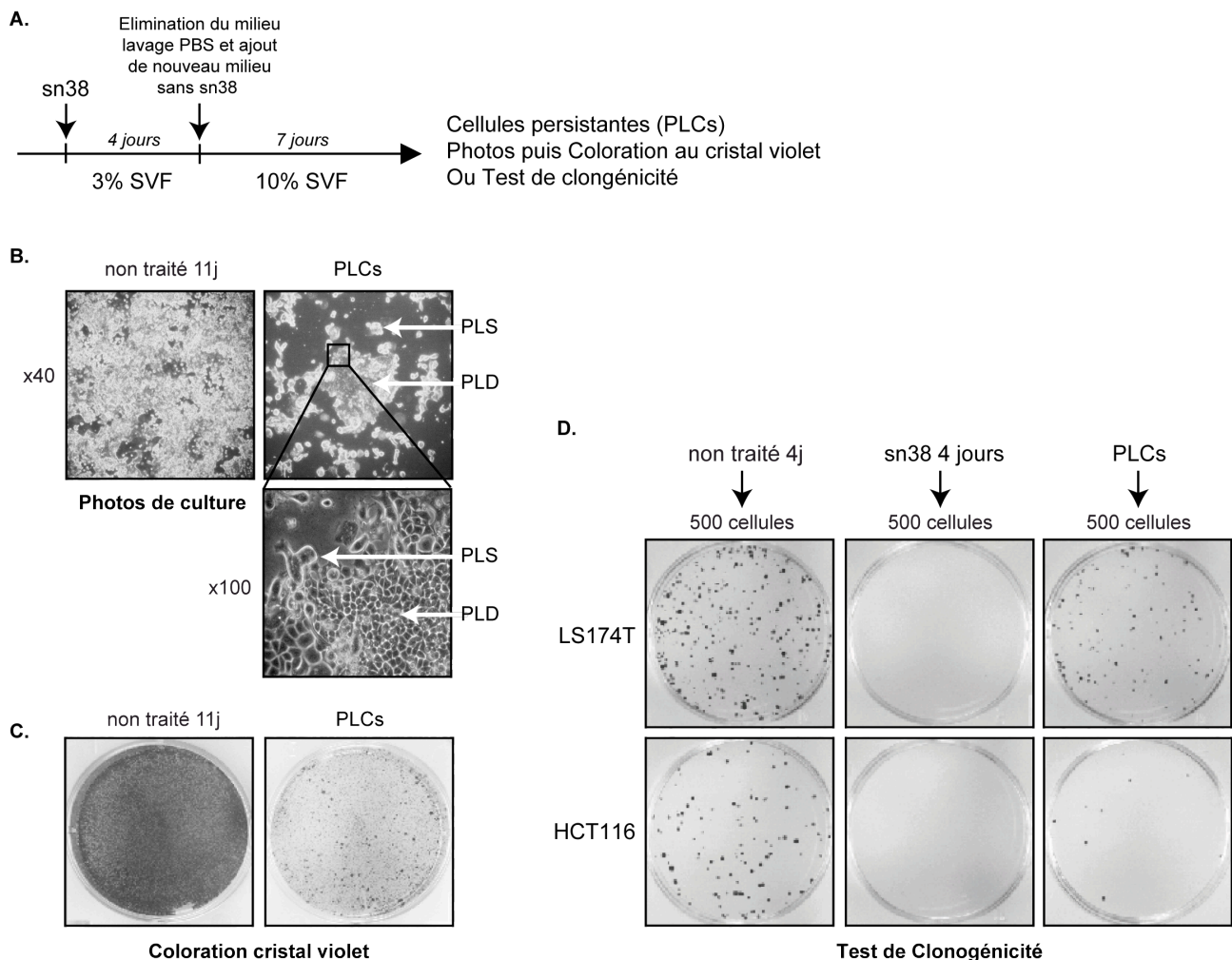


Figure 27 : Quantification de l'émergence des cellules PLD au sein des PLCs. **A.** Schéma expérimental conduisant à la génération de cellules persistantes. **B et C.** Des photos des cellules (B.) et une coloration au cristal violet (C.) des cultures cellulaires ont été réalisées à la fin du protocole présenté en A. Dans ce cas, les cellules non traitées ont été laissées le même temps en culture que les cellules PLCs, soit 11 jours. **D.** Pour quantifier la prolifération cellulaire des cellules HCT116 et LS174T, des tests de clonogénicité ont été réalisés à partir de cellules non traitées (4 jours), de cellules traitées pendant quatre jours et de cellules persistantes (photos représentatives de trois expériences).

Comme ce qui est attendu, sur les 500 cellules plantées au départ, aucun clone n'est visible pour la condition quatre jours de sn38 (Figure 27D). En effet, un traitement de quatre jours bloque la prolifération et induit la sénescence des cellules HCT116 et LS174T

(Figure 25). Cependant, lorsque le milieu des cellules traitées a été remplacé par du milieu 10% SVF pendant une semaine, un pourcentage non négligeable de cellules reprodifèrent, les PLD. Ce pourcentage de PLD chez les cellules LS174T est plus important que pour les cellules HCT116 (Figure 27D). Nous avons alors décidé de nous concentrer sur la lignée cellulaire LS174T.

Dans les PLCs, le pourcentage de PLD n'est pas figé, en effet, les deux populations de cellules, proliférantes et sénescents, évoluent différemment. La Figure 28 représente schématiquement l'évolution de ces deux populations composant les PLCs. Les cellules proliférantes sont peu nombreuses au début, puis leur nombre augmente et leur part au sein des PLCs aussi. En revanche, les PLS semblent stables. Leur nombre ne semble pas varier mais leur pourcentage diminue au fur et à mesure de l'émergence des PLD. A sept jours après le changement de milieu qui suit les quatre jours de traitement avec le sn38, les PLS représentent environ 70% de la totalité des cellules (piste 3, Figure 26C).

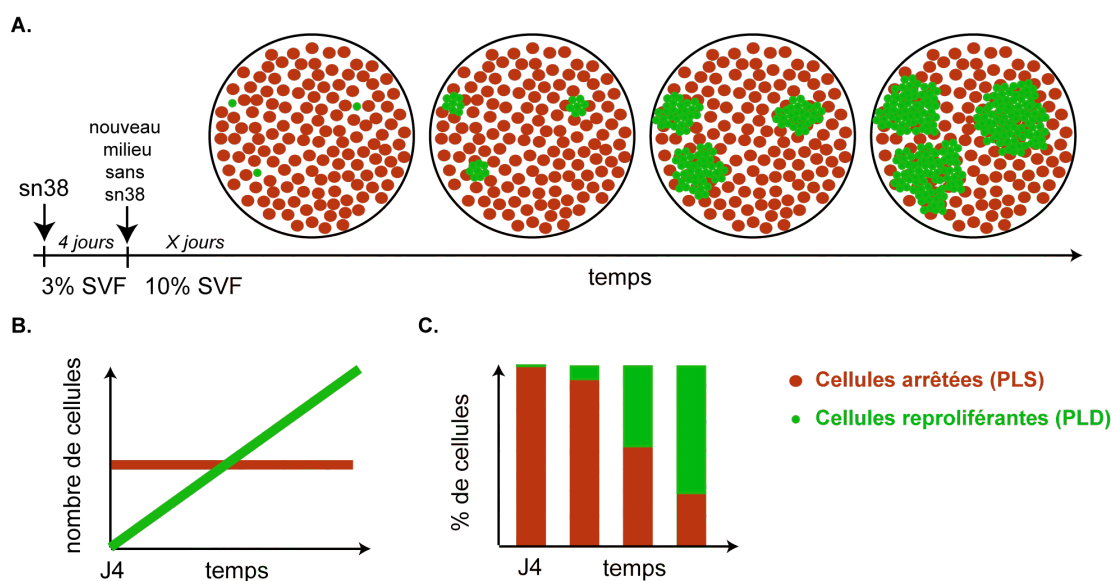


Figure 28 : Modèle schématisant l'évolution des cellules proliférantes (PLD) et sénescents (PLS) au sein des cellules persistantes (PLCs). **A.** Schéma représentant l'émergence des cellules PLD (en vert) au milieu des PLS (en rouge). **B et C.** Graphiques représentant de façon schématique le nombre (B.) et le pourcentage (C.) des cellules PLD et PLS au cours du temps après le traitement sn38 de quatre jours et le changement de milieu.

La persistance des cellules LS174T se caractérise par l'émergence de cellules proliférantes au sein des cellules sénescents après élimination du sn38. Nous nous sommes demandés si le phénomène de persistance était spécifique au traitement par le sn38. Nous avons donc testé deux autres traitements utilisés dans les cancers colorectaux : l'oxaliplatine et le 5FU.

3.1.3. Le phénomène de persistance n'est pas spécifique au sn38, il est aussi observé en réponse à l'oxaliplatine.

Dans les études cliniques, l'oxaliplatine est administrée à la dose de 85mg/m². Les doses de platine mesurées dans le sang sont inférieures à 1,5mg/L ce qui équivaut à 3,77µM d'oxaliplatine (Burz et al., 2009). Nous avons traité les cellules avec une dose proche, 5µM. Concernant le 5FU, il est utilisé notamment par injection à raison de 400mg/m². Quelques minutes après l'injection, les concentrations de 5FU mesurées dans le sang sont de 430µM et diminuent très rapidement pour atteindre 10µM, 1h après l'injection (Casale et al., 2004). Nous avons traité les cellules avec une dose comprise entre ces deux doses, soit 50µM. Pour tester la capacité des cellules à émerger, nous avons coloré au cristal violet les cellules directement après la procédure présentée sur la Figure 29A.

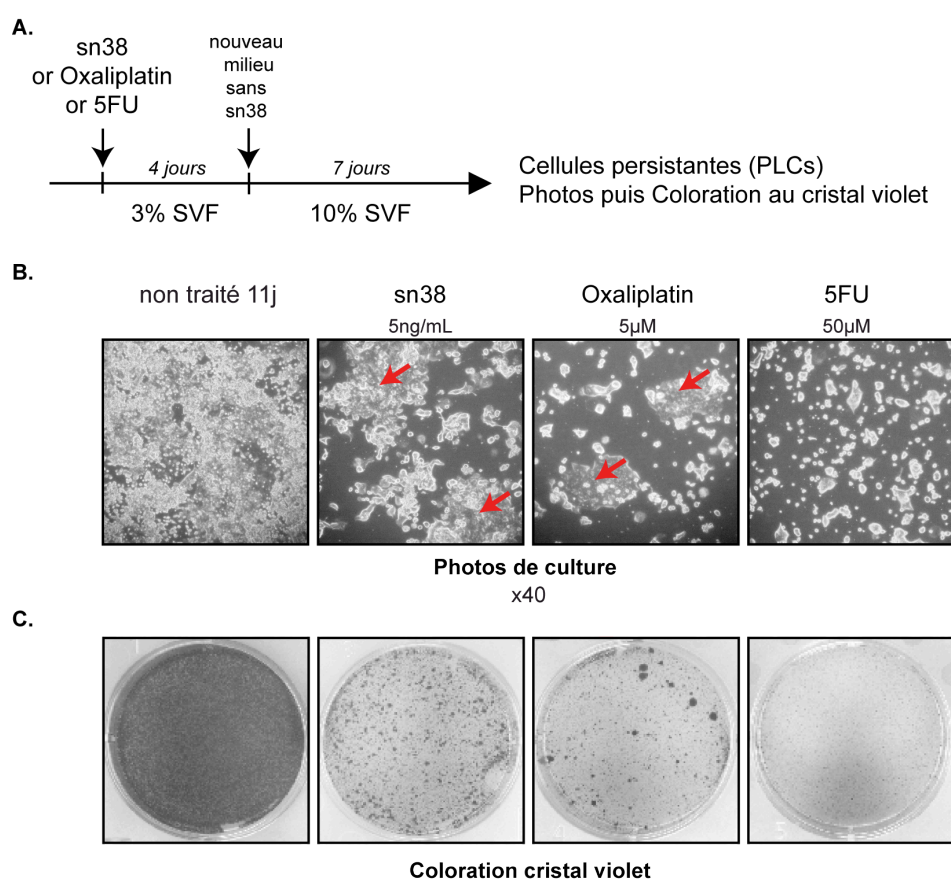


Figure 29 : La présence de PLCs est aussi détectée en réponse à l'oxaliplatine. **A.** Les cellules LS174T ont été traitées pendant quatre jours avec les différents traitements aux doses indiquées. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du milieu 10% SVF comme indiqué sur le schéma de la procédure. **B et C.** A la fin de ce protocole, des photos des cellules ont été prises (B.) et la coloration au cristal violet a été effectuée (C.). Des images représentatives sont présentées (n=3). Les flèches rouges indiquent les clones de PLD sur les photos des cultures.

Les clones de cellules PLD apparaissent sous la forme de points denses et foncés correspondant aux clones visibles sur les photos de culture (flèches rouges, Figures 29B et 29C). Pour le traitement par l'oxaliplatine, des clones de PLD sont visibles sur les photos et après la coloration (Figures 29B et 29C). Concernant le 5FU, la présence de différentes populations proliférantes et non proliférantes n'est pas mise en évidence sur les photos de culture et sur la coloration au cristal violet. Cela signifie que le phénomène de persistance, correspondant à la coexistence de PLD et de cellules arrêtées dans le cycle cellulaire, présent après le traitement sn38, est observé suite au traitement par l'oxaliplatine mais pas suite au traitement par le 5FU. Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation de l'émergence des PLCs. Alors que nous savions que les cellules sénescentes étaient majoritairement des cellules tétraploïdes (Figure 25C), nous nous sommes ensuite demandés quelle était la ploïdie des PLCs.

3.1.4. Les cellules persistantes sont constituées d'un mélange de cellules polyploïdes, tétraploïdes et diploïdes.

Les cellules persistantes sont composées de cellules avec différentes quantités d'ADN : 2N, 4N et 8N (Figure 30A). Les cellules dont la quantité d'ADN est supérieure à 4N, les cellules polyploïdes, sont présentes à quatre jours de traitement avant le changement de milieu et se maintiennent dans les PLCs (Figures 25C et 30A). Nous avons voulu savoir si ces cellules proliféraient et à quelle population elles appartenaient, PLD ou PLS. Pour cela, nous avons semé les cellules à faible confluence, comme pour un test de clonogénicité. Au bout de sept jours de prolifération, les PLD ont théoriquement pris l'avantage, en terme de pourcentage, sur les PLS. Les cellules sont décollées puis marquées avec du DAPI. Les PLD constituant les PLCs ont finalement un cycle cellulaire 2N/4N très semblable à celui des cellules LS174T parentales (profils de FACS, Figure 30B) et contiennent beaucoup moins de cellules polyploïdes (pistes 3 et 5, Figure 30B).

Nous nous sommes alors demandés si les dommages de l'ADN, générés par le sn38, étaient toujours présents dans les PLCs. Nous avons marqué les cellules avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de H2AX sur le Ser139. Deux jours après le traitement, les dommages de l'ADN sont bien présents (piste 2, Figure 30C). La signalisation de ces dommages diminue dès quatre jours après le début du traitement et revient au taux de base dans les PLCs (pistes 1, 3 et 4, Figure 30C). Malgré les défauts de ploïdie, les cellules n'ont plus de dommages de l'ADN ou perdent la signalisation de ces dommages.

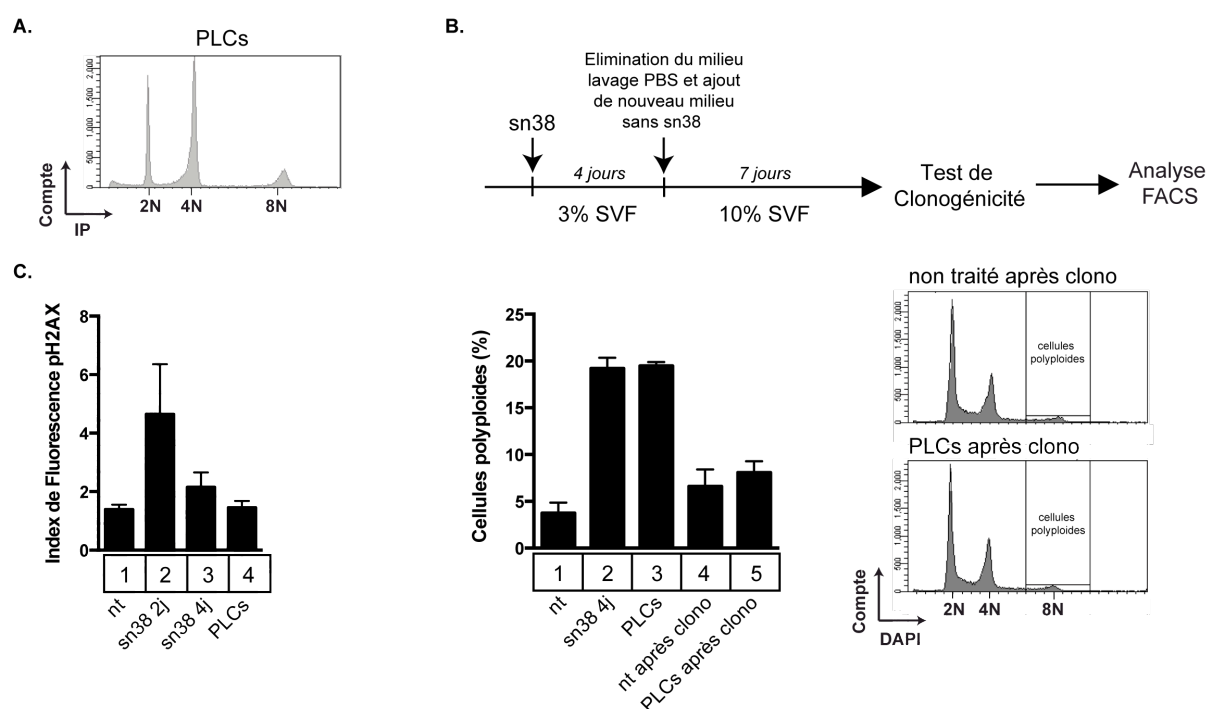


Figure 30 : Les PLCs contiennent des cellules polyploïdes non proliférantes. **A.** La coloration Vindelov 83 des cellules PLCs a été réalisée puis analysée par cytométrie de flux (images représentatives de trois expériences). **B.** La capacité proliférative des cellules polyploïdes (>4N) a été étudiée. Des PLCs et des cellules non traitées ont été générées puis les cellules ont été décollées et replantées dans des conditions de clonogénicité. Après sept à dix jours de prolifération, les cellules ont été marquées avec du DAPI et analysées par cytométrie de flux pour quantifier le pourcentage de cellules polyploïdes présentes avant et après cette procédure (n=3+/-sd). Des images représentatives des trois expériences sont présentées à droite. **C.** Les dommages de l'ADN ont été évalués dans les différentes conditions par marquage FACS avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de H2AX sur la sérine 139. La moyenne de fluorescence est présentée (n=4 +/-sd).

Les cellules PLCs sont donc constituées de cellules avec différentes ploïdies. L'instabilité génétique associée aux défauts de ploïdie étant impliquée dans la tumorigenèse, nous avons ensuite voulu savoir si ces PLCs étaient plus agressives que les cellules parentales.

3.1.5. Le traitement permet l'acquisition d'une résistance à l'anoïkis qui est augmentée chez les PLCs.

Nous nous sommes demandés si les PLCs avaient acquis des caractéristiques pouvant expliquer une résistance à une deuxième dose de sn38, une rechute ou l'apparition de métastases. Pour tester la sensibilité au sn38, nous avons réalisé des expériences de clonogénicité à partir des PLCs et des LS74T parentales. Aucune différence de sensibilité au sn38 n'a pu être mise en évidence (Figure 31A). Concernant l'implication des PLCs dans la possibilité d'une rechute, nous avons testé leur pouvoir tumorigénique via des expériences de xénogreffes. Après avoir injecté les cellules dans le flanc de souris

immuno-déficientes, nous avons mesuré la taille des tumeurs. Malgré le fort pourcentage de cellules sénescents, les tumeurs générées à partir des PLCs sont de tailles très proches de celles générées à partir des LS174T parentales (Figure 31B). Au sein des tumeurs générées à partir des PLCs, les cellules mitotiques sont plus nombreuses et il y a moins de cellules nécrotiques que dans celles générées à partir des LS174T (Figures 31C et 31D). Les PLCs semblent donc avoir un plus fort pouvoir tumorigénique que les cellules parentales. Au vue de l'hétérogénéité des PLCs, ce résultat est difficile à interpréter. Des tests de dissémination métastatique sont en cours.

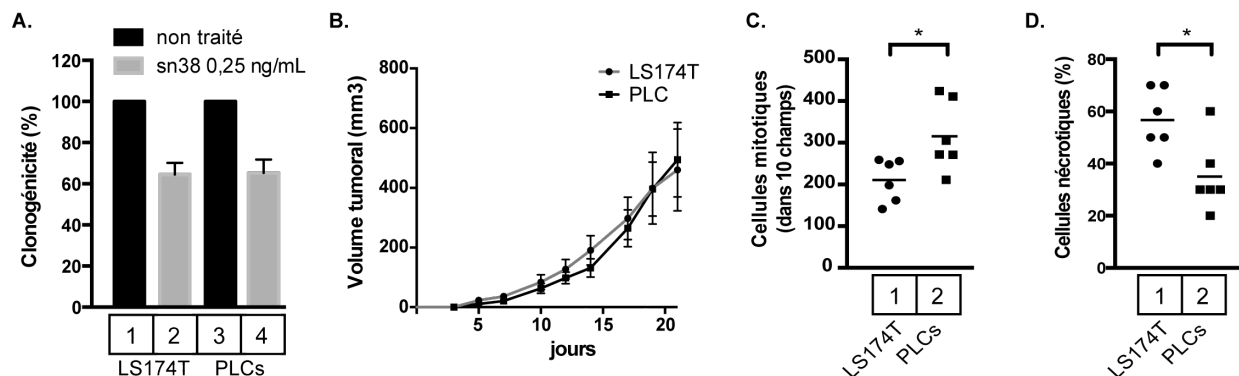


Figure 31 : Les PLCs n'ont pas acquis de résistance au sn38 en clonogénicité mais elles sont autant voire plus tumorigéniques que les cellules parentales. **A.** La sensibilité des LS174T parentales et des PLCs au sn38 a été analysée par clonogénicité (n=3+/-sd). **B.** Evaluation de la croissance in vivo des cellules LS174T parentales et des PLCs. Les cellules ont été injectées en sous-cutané chez des souris immuno-déficientes, le volume tumoral a été mesuré durant une vingtaine de jours (n=6 +/- sd). **C et D.** Les tumeurs ont ensuite été fixées puis colorées H&E avant d'être observées au microscope (x40). Le nombre de cellules mitotiques (C.) et le pourcentage de cellules nécrotiques (D.) ont été quantifiés (n=6 +/- sd).

Enfin, nous avons testé la capacité des cellules à résister à l'anoikis. Nous avons déposé les cellules dans de l'agar, dont la température de fusion est faible, à 0,35% final. Les cellules sont alors en condition de faible adhérence. La survie et la prolifération dans ces conditions suggèrent une augmentation de la transformation cellulaire. Au bout d'une vingtaine de jours, le pourcentage de cellules capables de former des clones a été évalué. Le point non traité correspond à des cellules semées en RPMI 3% SVF pendant cinq jours. C'est le point contrôle du point traité sn38 pendant quatre jours, le traitement se faisant sur des cellules adhérentes, un jour après les avoir plantées. Le pourcentage de cellules capables de pousser dans ces conditions précises pour le point non traité est très faible (piste 1, Figure 32A). Notez que lorsque ces cellules sont cultivées en 10% SVF, ce pourcentage est augmentée. En revanche, pour les cellules traitées pendant quatre jours, ce pourcentage est environ de 0,06% (piste 2, Figure 32A). Cette capacité est donc induite par le traitement et ne correspond probablement pas à des cellules préexistantes. La

même observation est faite lorsque l'on remplace l'agar par un milieu riche en protéines de la matrice extra-cellulaire, plus proche des conditions physiologiques, le matrigel (Figure 32B). Dans cette matrice, 0,1% des cellules traitées forment des clones alors que ce pourcentage est nul pour les cellules non traitées. On ne peut probablement pas attribuer ce résultat à un enrichissement de cellules. En effet, dans les cellules LS174T, un traitement de quatre jours induit un arrêt du cycle cellulaire et le phénotype de sénescence (Figures 25 et 26). Et contrairement au processus apoptotique, qui est responsable de la disparition de cellules, lors du processus de sénescence les cellules ne disparaissent pas. Cela signifie que, si des cellules, capables de pousser dans ces conditions, étaient présentes avant le traitement, le pourcentage de cellules non traitées sur les Figures 32A et B serait probablement identique à celui des cellules traitées quatre jours. Le traitement au sn38 permet donc certainement l'acquisition de cette caractéristique de croissance en faible adhérence.

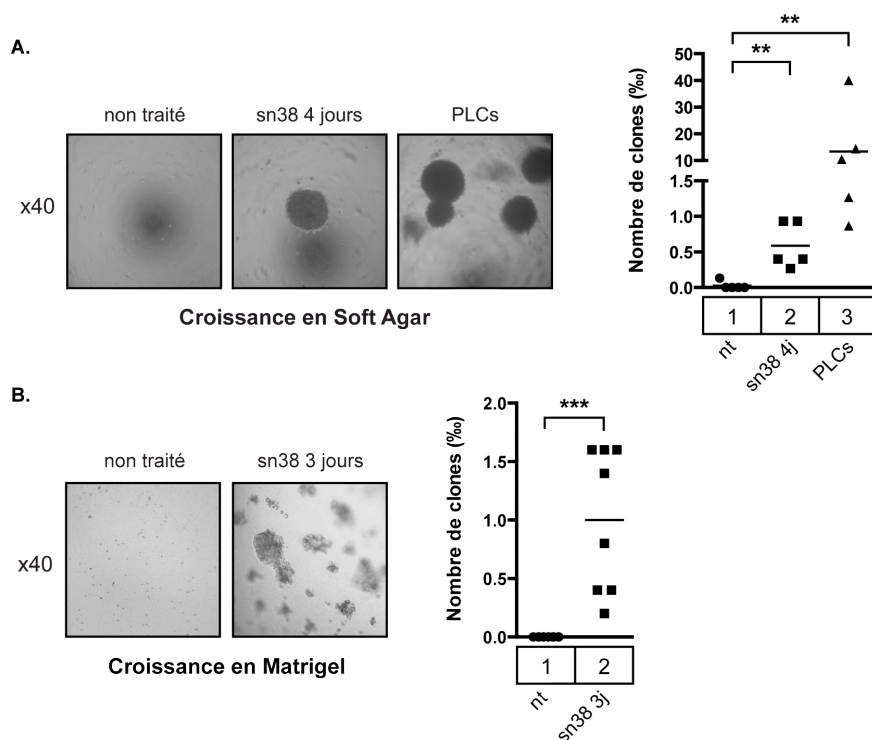


Figure 32 : Le traitement sn38 induit une résistante à l'anoikis qui est augmentée chez les PLCs. A et B. La capacité de croissance en faible adhérence des cellules LS174T non traitées, traitées quatre jours et des PLCs a été évaluée dans du soft agar (A) ou dans du matrigel (B). 5 000 cellules ont été plantées pour chaque condition. Des photos représentatives sont présentées (x40) et le nombre de cellules formant des clones dans ces conditions a été quantifié après 10 à 20 jours (n=5 pour le soft agar et 8 pour le matrigel).

Dans les PLCs, le pourcentage de cellules capables de résister à l'anoikis est encore augmenté et atteint environ 1,2% (piste 3, Figure 32A). Cela signifie que ces cellules agressives se sont amplifiées après le changement de milieu, entre la condition quatre jours de traitement et la condition PLCs.

L'ensemble de ces résultats montrent que les PLCs n'ont pas acquis de résistance au sn38 (Figure 31A), cependant elles semblent conserver la capacité tumorigénique des cellules parentales in vivo (Figure 31B). De plus, elles ont une caractéristique des cellules métastatiques que n'ont pas les cellules parentales dans les conditions de l'expérience, la résistance à l'anoikis (Figure 32).

Pour conclure cette première partie, les cellules LS174T entrent donc en sénescence en réponse au traitement génotoxique comme le sn38 (Figure 25). Cependant, des cellules conservent leur capacité de prolifération et exerce cette capacité lorsqu'elle sont stimulées avec du sérum (Figures 26, 27 et 33). Des cellules proliférantes (PLD) émergent donc au milieu des cellules sénescents (PLS). Ces cellules constituant la population totale sont qualifiées de cellules persistantes (PLCs). Ces cellules n'acquièrent pas de résistance au sn38 en clonogénicité mais elles pourraient être plus tumorigéniques que les cellules parentales (Figure 31). De plus, les cellules traitées par le sn38 avant la stimulation avec le sérum ainsi que les cellules PLCs acquièrent la capacité de croître en faible adhérence (Figures 32 et 33).

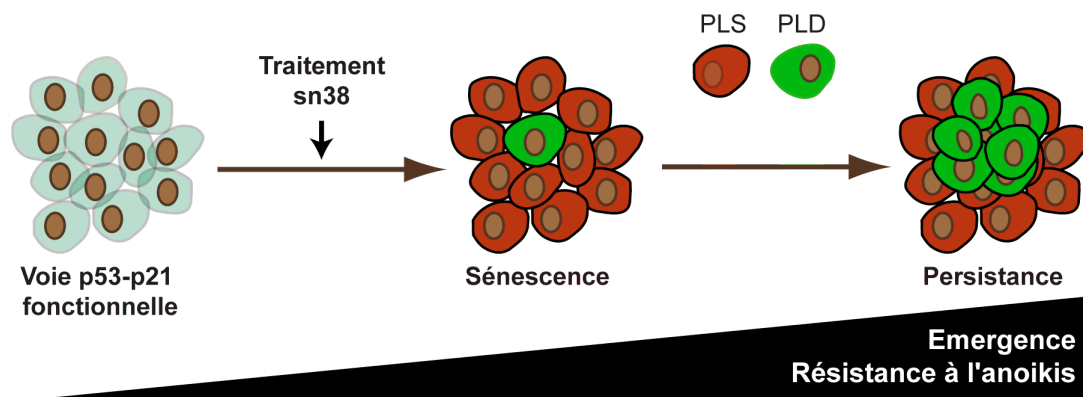


Figure 33 : Echappement à la sénescence et acquisition de la résistance à l'anoikis suite au traitement par le sn38. Lors du traitement sn38, la majorité des cellules, dont la voie p53-p21 est fonctionnelle, entrent en sénescence. Mais, lorsque les cellules traitées sont stimulées avec du sérum, une petite proportion de cellules sont capables de re-proliférer. La persistance se caractérise par la coexistence de cellules proliférantes (PLD) et de cellules sénescents (PLS). Les cellules traitées avec le sn38 et les PLCs ont une capacité de croissance en condition de faible adhérence qui est augmentée.

Nous nous sommes demandés de quels mécanismes dépendaient l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis. Nous nous sommes intéressés à trois notions ayant un lien avec la résistance à la chimiothérapie : les cellules souches cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et les voies de survie.

3.2. L'émergence des PLD et la résistance à l'anoikis dépendent des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont souvent mises en cause dans les phénomènes de résistance à la chimiothérapie et dans la rechute tumorale (Dallas et al., 2009) (Kemper, Grandela, & Medema, 2010) (Anderson, Hessman, Levin, Monroe, & Wong, 2011) (Izumiya et al., 2012) (Colak et al., 2014). Leur faible prolifération les rendrait moins sensibles aux traitements génotoxiques. Ces derniers induiraient la mort de la majorité des cellules mais aboutiraient à l'enrichissement des CSC. Comme ce qui a déjà été dit, dans nos expériences, à quatre jours de traitement, il n'y a probablement pas d'enrichissement de cellules puisque que la sénescence est induite mais il pourrait y avoir un enrichissement phénotypique (Iliopoulos, Hirsch, Wang, & Struhl, 2011). Nous nous sommes donc demandés si les CSC pouvaient être responsables de l'échappement à la sénescence et de la résistance à l'anoikis.

3.2.1. La salinomycine, ne bloque pas l'échappement à la sénescence ni la résistance à l'anoikis.

La salinomycine a été identifiée comme une molécule diminuant le nombre de CSC mammaires CD24^{low}CD44^{high} (Gupta et al., 2009). Nous avons donc testé l'effet de la salinomycine en combinaison avec le sn38 pour savoir si elle pouvait améliorer la réponse au traitement. Nous avons voulu savoir si le nombre de cellules PLD au sein des PLCs était modifié entre la condition sn38 et salinomycine et la condition sn38 seul. Les cellules traitées dans ces différentes conditions ont donc été utilisées pour semer des tests de clonogénicité. Deux concentrations de salinomycine ont été testées. Quelle que soit la concentration de salinomycine utilisée, trois fois plus de clones sont détectées avec les PLCs obtenues après la combinaison des deux traitements par rapport au traitement par le sn38 seul (Figure 34A). De façon surprenante, cela signifie que la proportion de PLD au sein des PLCs est augmentée suite à la combinaison. Nous nous sommes aussi intéressés à l'effet de la salinomycine sur la capacité de croissance en faible adhérence. Nous avons voulu savoir si le pourcentage de cellules capables de pousser dans ces conditions était modifié entre la condition sn38 seul et la condition sn38 et salinomycine. Entre ces deux conditions, le pourcentage passe de 0,25% à 2,5% environ (Figure 34B). En plus d'augmenter l'échappement à la sénescence induite après le traitement par le sn38, la salinomycine augmente la capacité de croissance en faible adhérence observée en réponse au sn38.

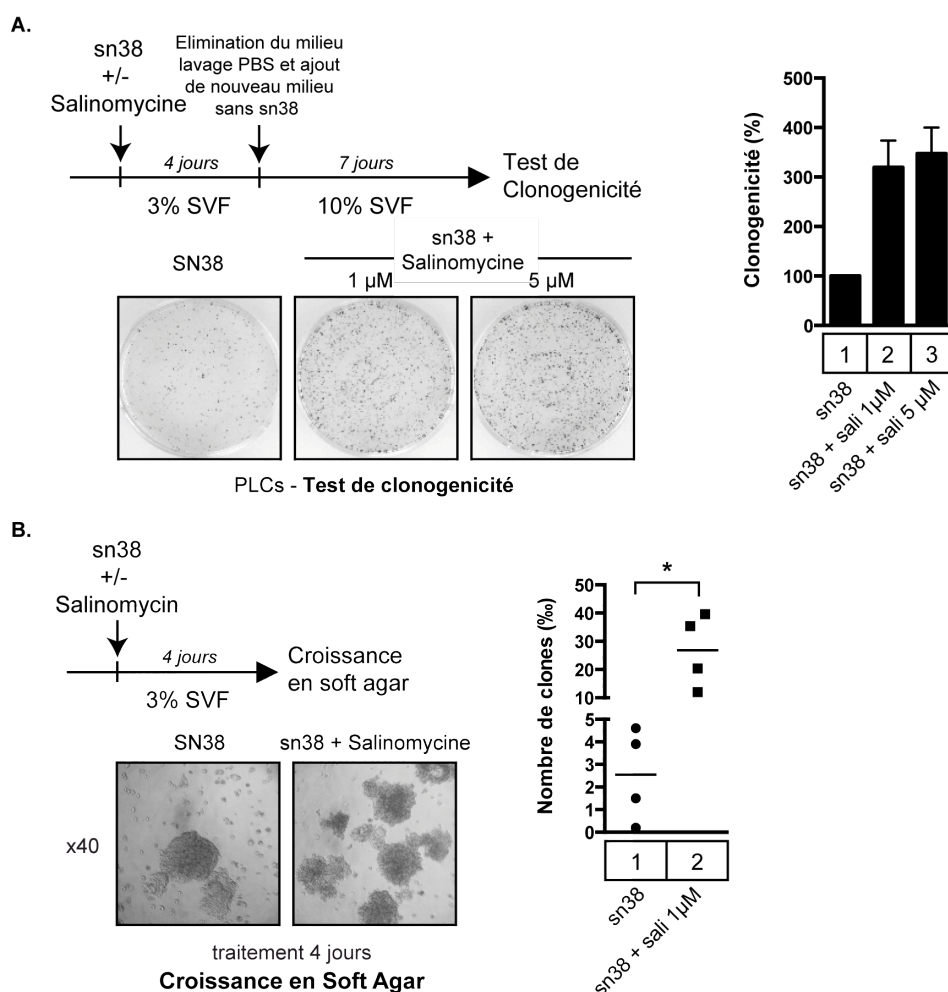


Figure 34 : La salinomycine, utilisée en combinaison avec le sn38, augmente l'émergence et la résistance à l'anoïkis. A. Les cellules LS174T ont été traitées avec du sn38 (5ng/mL) dans du milieu 3% SVF pendant quatre jours avec ou sans salinomycine (1 ou 5µM). Les cellules ont ensuite été stimulées avec du nouveau milieu 10% SVF. Enfin, les cellules ont été semées pour des tests de clonogénicité. Des photos représentatives sont présentées à gauche (x40) et le pourcentage de clonogénicité est présenté à droite (pour la condition salinomycine 1µM : n=3+/-sd et pour 5µM : n=2 +/- sd). **B.** Les cellules ont été traitées avec le sn38 (5ng/mL) pendant quatre jours avec ou sans salinomycine (1µM). La croissance en soft agar a ensuite été évaluée, 5000 cellules ont été plantées pour chaque condition. Des photos représentatives sont présentées à gauche (x40) et le pourcentage de clones ayant cette capacité est présenté à droite (n=4 +/- sd).

Nous avons ensuite voulu vérifier que la salinomycine diminuait bien le pourcentage de CSC. Nous avons choisi de tester quelques marqueurs de CSC bien décrits dans les cancer colorectal comme CD44, LGR5, CD133 et l'activité de l'ALDH («aldehyde dehydrogenase») (Kemper et al., 2010) (Langan et al., 2013). Nous avons donc réalisé des marquages sur cellules fraîches avec des anticorps anti-CD44 APC, anti-LGR5 A647, anti-CD133 PE et avec le kit Aldefluor qui permet de détecter l'activité de l'ALDH.

Les contrôles isotypiques et la condition avec l'inhibiteur de l'ALDH, pour le kit Aldefluor, nous ont permis de placer la fenêtre correspondant à la population de cellules positives (Figure 35A). Dans ces conditions contrôles, les fenêtres sont placées de telle façon à ce que le pourcentage de cellules positives soit inférieur à 3% pour chaque marquage. Pour chaque condition, les marquages avec l'isotype contrôle et avec l'anticorps spécifique sont réalisés (Figure 35A). La fenêtre correspondant à la population de cellules positives, définit à partir de la condition contrôle, est copiée sur la condition avec l'anticorps spécifique. Le niveau d'expression de LGR5 et CD133 et le niveau d'activité de l'ALDH étant relativement faible, les marquages sont présentés en pourcentage de cellules positives (Figure 35A). En revanche, le niveau d'expression de CD44 est très élevé en comparaison avec ceux de LGR5, CD133 et avec l'activité de l'ALDH. Nous avons donc représenté les résultats en pourcentage de cellules exprimant un niveau élevé de CD44, de façon à représenter les différences d'expression entre les différentes conditions (Figure 35A). Ces différences d'expression auraient été masquées si nous avions représenté les résultats en terme de pourcentage de cellules positives. Les fenêtres CD44^{low} et CD44^{high} ont été placées de façon arbitraire dans la condition non traitées et ont été reportées dans les autres conditions en tenant compte de la fenêtre définissant la population négative (Figure 35A).

Le traitement par la salinomycine seul induit une diminution du pourcentage de cellules dont l'expression de CD44 est élevée et exprimant LGR5 (pistes 1, 3, 4 et 6, Figure 35B). En revanche, le pourcentage de celles exprimant les deux autres marqueurs reste stable (pistes 7 à 12, Figure 35B). Nous nous sommes aussi demandés comment évoluaient les cellules exprimant ces marqueurs au cours du traitement sn38 et dans les PLCs. Les cellules dont l'expression de CD44 est élevée, celles qui sont LGR5 positives et celles ayant une activité ALDH diminuent suite au traitement sn38 et sont très minoritaires dans les PLCs (pistes 1 à 4, 5 à 8 et 13 à 16, Figure 35C). La diminution du pourcentage de cellules exprimant ces marqueurs indiquerait soit que le pourcentage de CSC diminue soit que l'expression de ces marqueurs est simplement diminuée.

Dans tous les cas, nos résultats ne mettent pas en avant l'implication des CSC dans la résistance au traitement même si, en raison de l'incertitude des marqueurs dans le cancer colorectal et de la plasticité cellulaire, nos résultats ne peuvent pas exclure complètement que ces cellules aient un rôle.

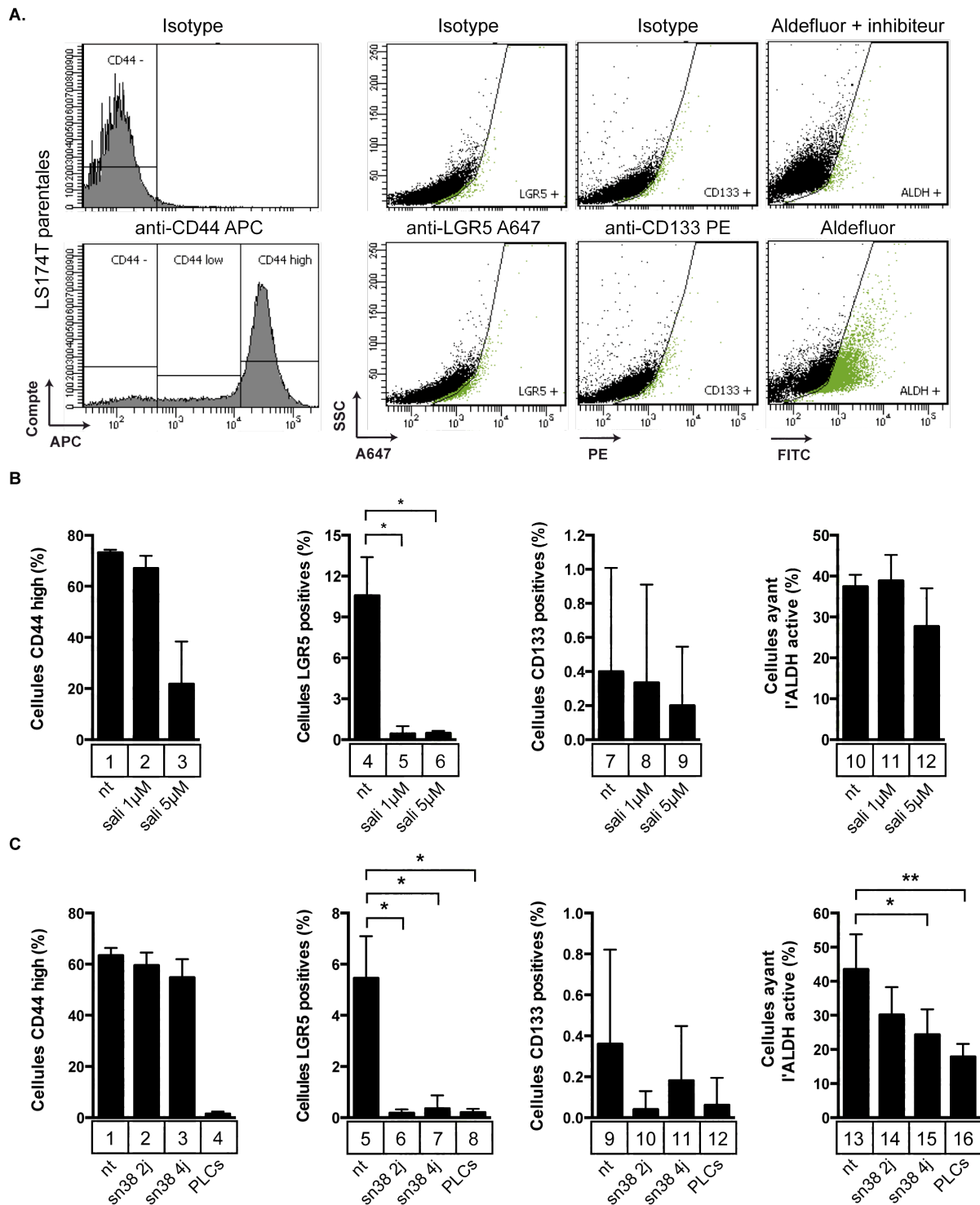


Figure 35 : Marquage des CSC colorectales suite au traitement sn38 et dans les PLCs. A-C. Des marquages avec des anticorps dirigés contre CD44, LGR5, CD133 et un marquage révélant l'activité de l'ALDH ont été effectués puis analysés par cytométrie de flux. **A.** Les cellules LS174T parentales, cultivées en 3% SVF pendant 3 jours sans traitement, ont été marquées (il s'agit de la condition non traitées en C.). Le pourcentage de cellules positives ou «high» est présenté (n=3 +/-sd sauf pour LGR5 et CD133 : n=4 +/-sd) **B.** Les cellules traitées avec la salinomycine (1 ou 5 μM) pendant quatre jours en 10% SVF ont été marquées. Le pourcentage de cellules positives ou «high» est présenté (n=3 +/-sd sauf pour LGR5 : n=4 +/-sd) **C.** Les cellules LS174T non traitées, traitées avec le sn38 pendant deux jours, traitées pendant quatre jours et les PLCs ont aussi été marquées et analysées (n=3 +/-sd sauf pour LGR5 et CD133 : n=4 +/-sd).

Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par d'autres groupes. Par exemple, l'étude de Hedge *et al* s'intéresse aux caractéristiques des tumeurs résiduelles après une chimiothérapie chez des souris ayant eu une xénogreffe. Dans ces tumeurs résiduelles, les cellules exprimant CD44 ou CD133 ne sont pas enrichies. Cependant, elles perdent l'expression de l'E-cadhérine et acquièrent l'expression de la vimentine et d'autres marqueurs de l'EMT (Hegde et al., 2012). Nous nous sommes donc intéressés à ce mécanisme, la transition épithélio-mésenchymateuse. En conférant une plasticité aux cellules cancéreuses, elle est impliquée dans la chimiorésistance, dans l'échappement à la sénescence oncogénique mais également dans la résistance à l'anoikis (Z. Wang et al., 2009) (A. Singh & Settleman, 2010) (Ansieau et al., 2008) (Jia et al., 2012).

3.2.2. Les facteurs d'EMT Slug et Zeb1, exprimés suite au traitement sn38, ne participent pas à la résistance à l'anoikis.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des marqueurs de l'EMT. La quantité d'ARN de la vimentine et du TGF- β augmente suite au traitement par le sn38 (pistes 1, 2, 5 et 6, Figure 36A). Au niveau protéique, l'E-cadhérine est très peu exprimée dans les LS174T parentales par rapport aux cellules HCT116 (pistes 1 et 2, Figure 36B). ce qui est déjà décrit dans la littérature (Gavert, Vivanti, Hazin, Brabletz, & Ben-Ze'ev, 2011). Cela signifie que les cellules LS174T ont déjà des caractéristiques mésenchymales. Les facteurs de transcription Twist1, Twist2 et Zeb2 ne sont pas exprimés dans les LS174T. En revanche dès deux jours de traitement, l'expression transcriptionnelle de Slug et Zeb1 est fortement induite (pistes 13, 14, 17 et 18, Figure 36C). Snail, un autre facteur de transcription de l'EMT, est aussi induit au niveau transcriptionnel, mais de façon plus faible (pistes 9 et 10, Figure 36C). L'ensemble de ces marqueurs d'EMT, excepté Snail, voit son expression transcriptionnel diminuer dans les PLCs (pistes 4 et 8, Figure 36A; pistes 12, 16 et 20, Figure 36C). Nous nous sommes intéressés à Slug et Zeb1 qui sont fortement induits en réponse au sn38. Au niveau protéique, les variations de Slug sont proches de celles de son ARN (Figure 36D). Zeb1 est une protéine de haut poids moléculaire. Le western blot étant difficile à réaliser, nous n'avons pas pu la détecter.

Au vue des propriétés décrites des facteurs de transcription Slug et Zeb1, nous avons étudié leur implication dans le phénomène d'échappement à la sénescence induite par le traitement sn38 (Kurrey et al., 2009) (Tanno et al., 2010) (Smit & Peeper, 2011) (Sánchez-Tilló et al., 2013) (Siebzehnruhl et al., 2013) (Kao et al., 2014). L'utilisation d'ARN interférent a permis de diminuer l'expression de Slug mais nous n'avons pu montrer qu'une légère diminution de Zeb1 au niveau transcriptionnel (Figure 37).

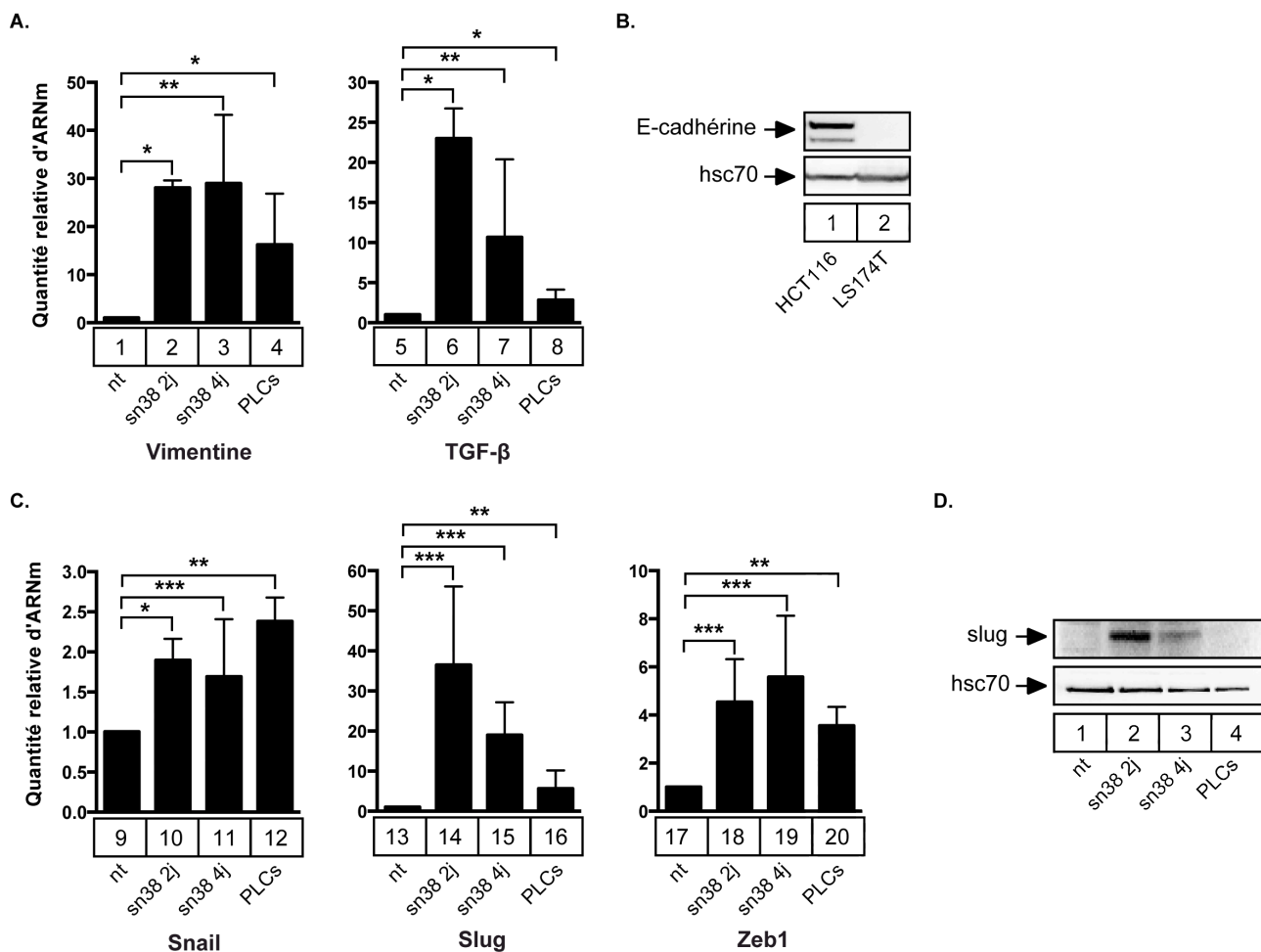


Figure 36 : Expression de la vimentine, du TGF-β, de Snail, Slug et Zeb1 en réponse au traitement sn38 et dans les PLCs. **A.** L'expression transcriptionnelle de la vimentine et du TGF-β a été évaluée par RT-PCR quantitative dans des cellules LS174T non traitées, traitées deux et quatre jours et dans les PLCs (n=2 pour sn38 2j, n=6 pour sn38 4j et n=3 pour les PLCs +/-sd). **B.** L'expression protéique de l'E-cadherine et hsc70 a été évaluée par western blot sur des extraits totaux de cellules non traitées HCT116 et LS174T (n=2). **C.** L'expression transcriptionnelle de Snail, Slug et Zeb1 a été évaluée par RT-PCR quantitative dans des cellules LS174T non traitées, traitées deux et quatre jours et dans les PLCs (n=3 pour sn38 2j, n=5 pour sn38 4j et n=3 pour les PLCs +/-sd). **D.** L'expression protéique de l'E-cadherine et hsc70 a été évaluée par western blot sur des extraits totaux de cellules LS174T non traitées, traitées deux et quatre jours et dans les PLCs (n=3).

La transfection de siRNA dirigés contre l'ARN de ces deux facteurs est réalisée 24h avant le traitement sn38. Les protocoles de traitement sont présentés sur la partie supérieure de la Figure 37. L'extinction de Slug induit une augmentation significative du nombre de cellules proliférantes au sein des PLCs (Figures 37A et 37E). Ce résultat peut signifier deux choses. Soit la perte de Slug induit l'émergence, la re prolifération, d'un nombre plus important de cellules, soit, le même nombre de cellules émergent mais celles qui émergent prolifèrent plus vite et donc sont plus nombreuses à ce temps. En revanche, aucune différence du pourcentage de cellules capables de proliférer en faible adhérence n'a pu être mise en évidence (Figure 37B).

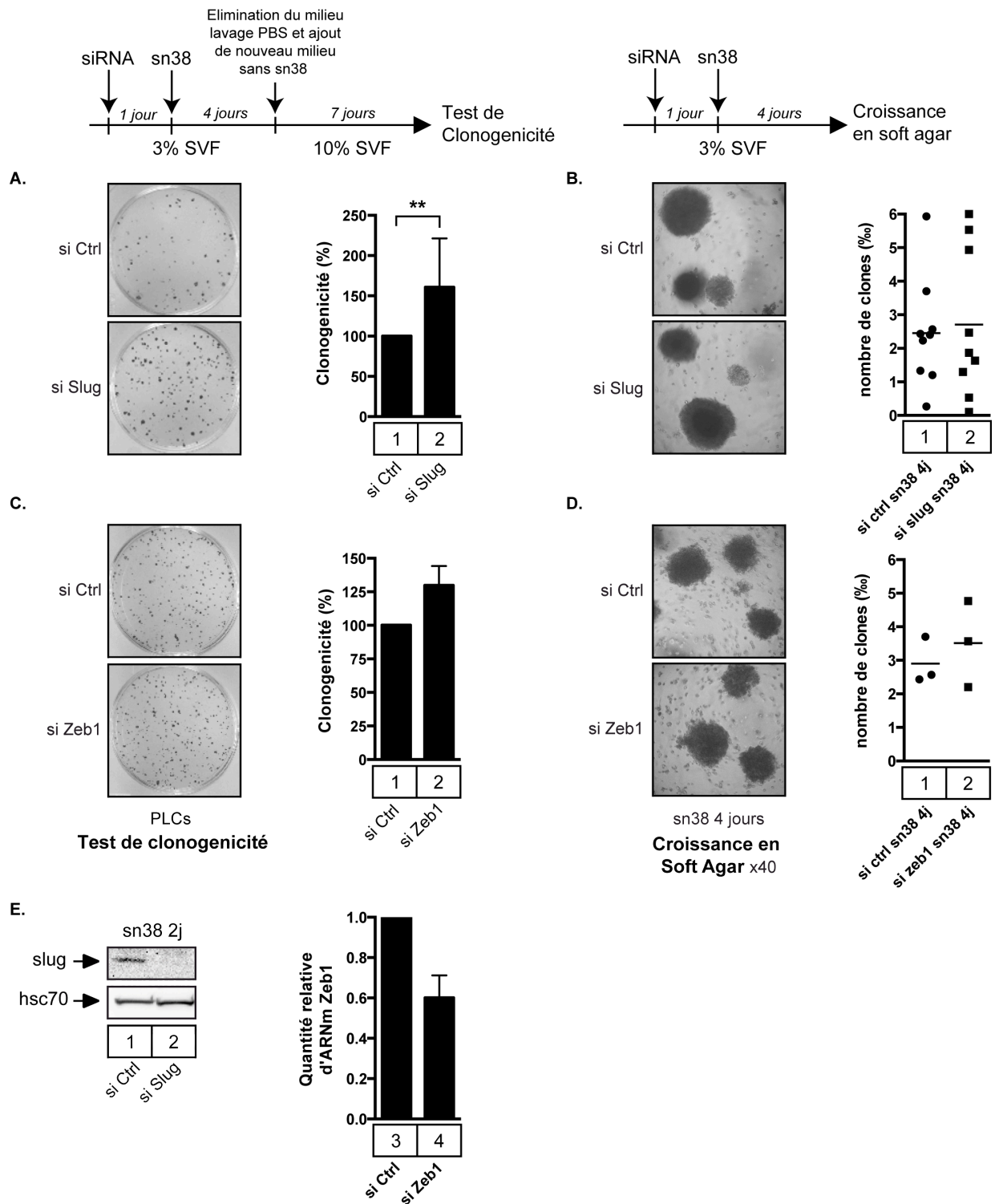


Figure 37 : Slug et Zeb1 ne sont pas impliqués dans la résistance à l'anoikis mais Slug semble limiter le nombre de PLD au sein des PLCs. A et C. Des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre Slug (A.) ou Zeb1 (C.) ou avec un siRNA contrôle ont été traitées pendant quatre jours et stimulées avec du nouveau milieu. Ces différentes conditions ont été décollées puis replantées suivant le protocole de clonogenicité. Des photos représentatives et la quantification sont présentées (n=5 pour Slug et n=2 pour Zeb1 +/-sd). **B et D.** Des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre Slug (B.) ou Zeb1 (D.) ou un siRNA contrôle, ont été traitées pendant quatre jours. La croissance en soft agar a ensuite été évaluée, 10000 cellules ont été plantées pour chaque condition. Des photos représentatives et la quantification sont présentées (n=9 +/- sd pour Slug et n=3 +/- sd pour Zeb1). **E.** L'expression de Slug et Zeb1 a été évaluée par western blot (n=3) ou par RT-PCR quantitative (n=2 +/-sd) après transfection des ARN interférents.

Après la transfection de l'ARN interférent de Zeb1, ni le pourcentage de cellules PLCs proliférantes, ni la pousse en agar ne sont modifiés (Figures 37C, 37D et 37E). Les résultats concernant Zeb1 doivent cependant être pris avec précaution car la perte protéique n'a pas été validée. La différence observée du nombre de PLCs proliférantes entre la condition contrôle et la condition ARN interférent de Slug pourrait être due au rôle de Slug dans le cycle cellulaire récemment décrit (J. Liu et al., 2010) (Mittal, Singh, Misra, & Chaudhuri, 2011) (W.-L. Wang et al., 2014b). Cependant, ces résultats montrent clairement que les facteurs de transcription Slug et Zeb1, induits après le traitement, ne sont pas impliqués dans la résistance à l'anoikis observée.

L'anoikis est un mécanisme de mort cellulaire dépendant de la perméabilisation mitochondriale (MOMP) et notamment de l'expression de Bim (Collins et al., 2005) (Galluzzi et al., 2012). Nous nous sommes donc demandés si les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pouvaient être impliquées dans la résistance à l'anoikis suite au traitement par le sn38. De plus, une étude réalisée au laboratoire a montré que la survie de cellules ayant échappées à la sénescence induite par l'oncogène Ras dépendait des protéines Mcl-1 et Bcl-xL (de Carné Trécesson et al., 2011). Nous avons donc aussi étudié la sensibilité des cellules à l'inhibition de ces protéines suite au traitement sn38.

3.2.3. Les facteurs de survie Bcl-xL et Mcl-1 sont nécessaires à l'échappement à la sénescence et à la croissance en faible adhérence.

Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sont décrites dans la réponse aux traitements comme favorisant la survie lors de la catastrophe mitotique (Eichhorn et al., 2013) (Bah et al., 2014). De plus, leur rôle dans la résistance à l'anoikis, processus activant l'apoptose lors du détachement de la matrice extra-cellulaire, est connu (Boisvert-Adamo, Longmate, Abel, & Aplin, 2009) (Maamer-Azzabi et al., 2013). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ces protéines en réponse au traitement par le sn38.

3.2.3.1. Expression de la famille Bcl-2 en réponse au traitement.

Nous avons dans un premier temps étudié leur expression par western blot. Au niveau protéique, l'expression de Bcl-2 diminue nettement à quatre jours de traitement par le sn38 par rapport aux cellules non traitées (pistes 1 et 3, Figure 38A). A ce temps, l'expression de Bim, Bax et Mcl-1 est stable et celle de Bcl-xL augmente (pistes 1 et 3, Figure 38A). Au niveau transcriptionnel, Mcl-1 et Bcl-xL sont induits à deux jours de traitement par le sn38 (Figure 38B).

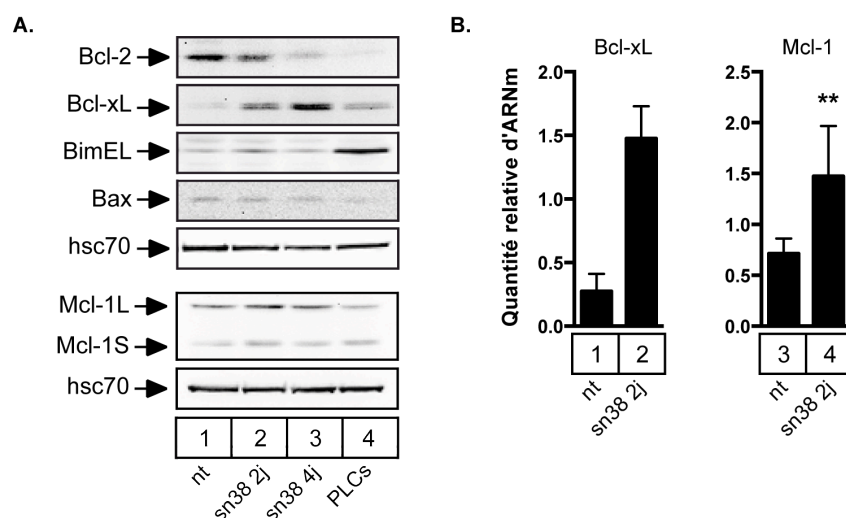


Figure 38 : Les protéines Bcl-xL et Mcl-1 sont exprimées au cours du traitement sn38. **A.** L'expression des protéines Bcl-xL, Bcl2, Mcl-1, Bim, Bax et hsc70 a été évaluée par western blot sur des extraits totaux de cellules LS174T non traitées, traitées deux et quatre jours et de PLCs (n=3). **B.** L'expression transcriptionnelle de Bcl-xL et Mcl-1 a été évaluée par RT-PCR quantitative dans les cellules LS174T non traitées et traitées deux jours (n=3 +/- sd pour Bcl-xL et n=5 +/- sd pour Mcl-1).

Dans les PLCs, l'expression protéique de Bim est fortement augmentée alors que celle de Bax est constante (piste 4, Figure 38A) et Noxa n'est pas exprimé. Du côté des protéines anti-apoptotiques, Bcl-2 n'est plus exprimée et le niveau d'expression de Mcl-1 est proche de celui des cellules non traitées (piste 4, Figure 38A). L'expression de Bcl-xL dans les PLCs diminue par rapport à la condition quatre jours de traitement mais est plus forte que dans les cellules non traitées (pistes 1, 2 et 4, Figure 38A). On peut donc penser que Bcl-xL limite l'effet pro-apoptotique de Bim. Nous nous sommes donc demandés si la survie des cellules LS174T au cours de la réponse au traitement dépendait de Bcl-xL et Mcl-1.

3.2.3.2. La survie des cellules LS174T traitées par le sn38 dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.

Nous avons utilisé un inhibiteur des protéines Bcl-2 et Bcl-xL, l'ABT-737. Cette molécule mime les protéines à domaine BH3 seul (Labi, Grespi, Baumgartner, & Villunger, 2008). En se fixant à Bcl-xL, comme le ferait une protéine à domaine BH3 seul, l'ABT-737 inhibe l'interaction avec les protéines à domaine BH3 seul qui sont donc libres d'activer Bax et Bak. Les cellules sont traitées avec le sn38 pendant quatre jours, l'ABT-737 est ajouté un jour avant la fin de la procédure comme indiqué sur le schéma (Figure 39A). Après le traitement au sn38, il n'y a pas de différence de pourcentage de cellules mortes entre les conditions avec ou sans ABT-737 dans les cellules LS174T (pistes 2 et 4, Figure 39A). En revanche, dans les cellules HCT116, l'utilisation de cette combinaison est très efficace et

la quasi totalité des cellules meurent (pistes 6 et 8, Figure 39A). Alors que l'expression de Bcl-2 diminue en réponse au traitement par le sn38, celle de Bcl-xL est augmentée dans les cellules HCT116 (pistes 1 et 3, Figure 39B). Cela signifie que la survie des cellules HCT116, après le traitement sn38, dépend de Bcl-xL.

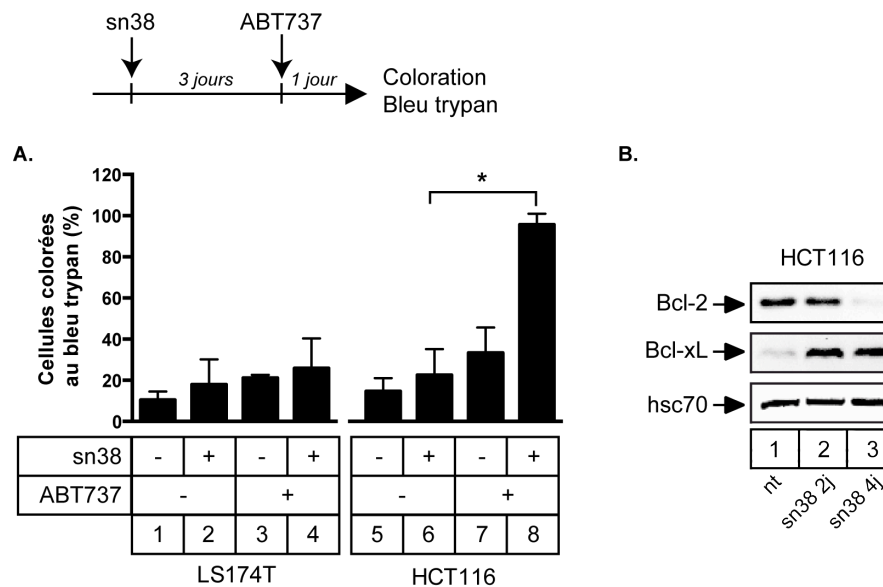


Figure 39 : Le traitement ABT-737 n'a pas d'effet sur la survie des cellules LS174T traitées au sn38.

A. Les cellules HCT116 et LS174T ont été traitées avec ou sans sn38 pendant trois jours suivi de l'ajout d'ABT-737 pendant un jour. La mort cellulaire a été analysée après coloration au bleu trypan ($n=3 \pm$ sd). **B.** L'expression de la protéine Bcl-xL a été évaluée par western blot dans les cellules HCT116 non traitées, traitées deux et quatre jours avec le sn38 ($n=3$).

A ce temps, Les cellules LS174T n'expriment pas Bcl-2 (piste 3, Figure 38A). On peut donc dire que la survie des cellules LS174T ne dépend pas de Bcl-xL, ou pas uniquement. Mcl-1 est décrit comme responsable de la résistance à l'ABT-737 (van Delft et al., 2006). L'ABT-737 n'est en effet pas capable d'inhiber l'activité de Mcl-1. Cette protéine pourrait donc compenser l'inactivation des protéines Bcl-2 et Bcl-xL par l'ABT-737.

Nous nous sommes donc demandés si, dans notre modèle, l'inhibition de Mcl-1, en combinaison au traitement ABT-737, pouvait améliorer la réponse au sn38. L'utilisation d'ARN interférence a permis de diminuer l'expression de Mcl-1 avant le traitement comme indiqué sur le schéma de la procédure (Figures 40A et 40B). Les résultats montrent que l'inhibition de Mcl-1 sensibilise les cellules LS174T non traitées à la mort cellulaire (Figures 40C et 40D). En effet, le pourcentage de cellules dont la quantité d'ADN est inférieure à 2N (SubG1) ou colorées par le bleu trypan augmente suite à l'inactivation de Mcl-1 en absence de traitement (pistes 1 et 5, Figures 40C et 40D).

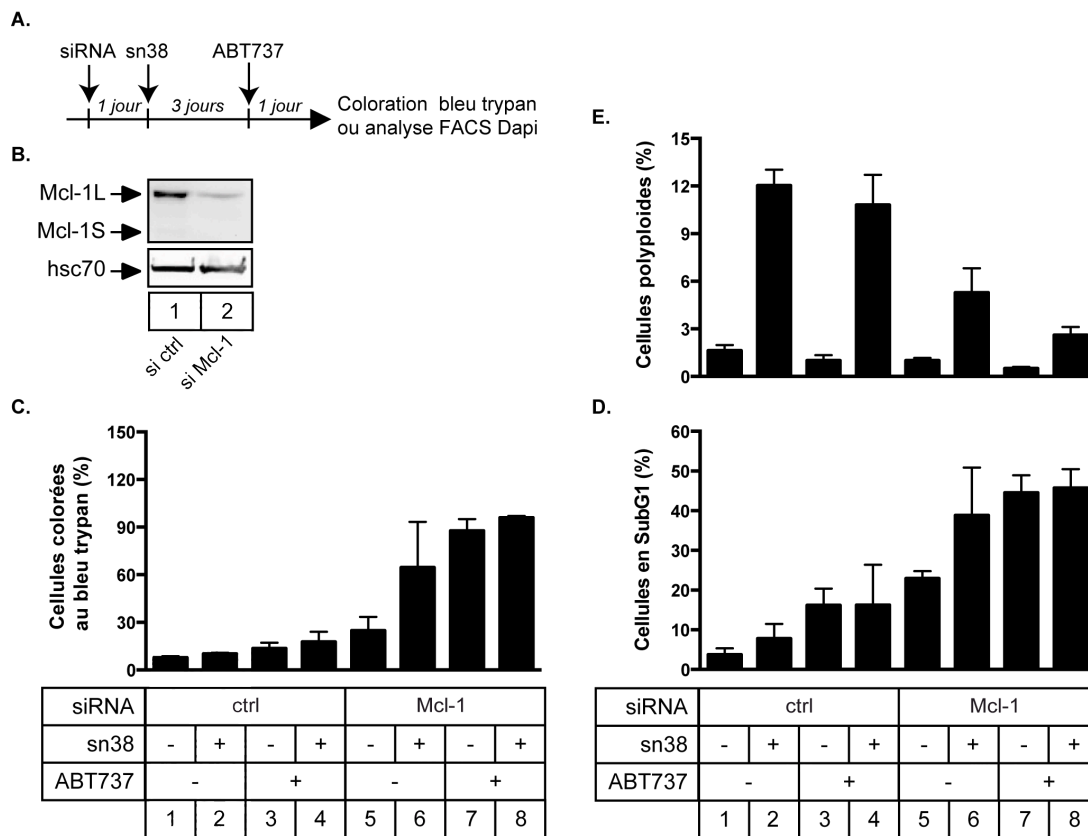


Figure 40 : Les protéines Mcl-1 et Bcl-xL sont impliquées dans la survie des cellules après le traitement sn38 et notamment celle des cellules polyploïdes. **A.** Schéma du protocole. **B** Suite à la transfection d'un siRNA dirigé contre Mcl-1, la perte d'expression de cette protéine a été validée par western blot (n=3). **C à E.** L'expression de Mcl-1 a été inhibée par ARN interférence. Un jour après, les cellules ont été traitées avec le sn38 pendant trois jours suivi de l'ajout d'ABT-737 pendant un jour comme indiqué sur le schéma (A.). La mort cellulaire a ensuite été analysée après une coloration au bleu trypan (C.) et après un marquage DAPI suivi d'une analyse FACS pour quantifier les cellules en SubG1 (D.) (n=3 +/-sd). Cette expérience a aussi permis de quantifier les cellules polyploïdes (E.) (n=3 +/-sd).

Suite au traitement sn38, l'inhibition de Mcl-1 augmente aussi la mort cellulaire par rapport à la condition siRNA contrôle (pistes 2 et 6, Figures 40C et 40D). Cela signifie que suite au traitement la survie des cellules repose en partie sur Mcl-1. En revanche, la mort cellulaire n'est pas clairement augmentée suite à la combinaison de l'inhibition de Mcl-1 et des traitements sn38 et ABT-737 par rapport à la condition sans ABT-737 (pistes 6 et 8, Figures 40C et D). Cependant lorsque l'on s'intéresse aux cellules polyploïdes, générées suite au traitement sn38, l'inhibition de Mcl-1 combinée au traitement ABT-737 diminue de façon synergique leur pourcentage (pistes 2, 6 et 8, Figure 40E). Cela signifie que la survie de ces cellules, présentant une quantité d'ADN anormale, dépend des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL. Les protéines Mcl-1 et Bcl-xL sont donc exprimées dans les cellules LS174T pendant ou suite au traitement sn38, probablement pour contrer des signaux pro-apoptotiques médiés par Bim.

3.2.3.3. L'émergence des PLD dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.

Nous sommes ensuite demandés si ces protéines participaient à l'émergence des PLD au sein des PLCs. La combinaison du traitement sn38 et de l'inhibition de Bcl-xL par l'ABT-737 n'a aucun effet sur le nombre de cellules proliférantes au sein des PLCs (Figure 41C; pistes 1 et 2, Figure 41D). En revanche, lorsque l'inhibition de Mcl-1, par ARN interférence, est réalisée en combinaison avec le traitement sn38, nous avons observé une diminution significative de la quantité de PLD au sein des PLCs (Figure 41C; pistes 1 et 3, Figure 41D). La combinaison de l'inhibition de Mcl-1 et du traitement ABT-737 semble augmenter cet effet mais de façon non significative (Figure 41C; piste 3 et 4, Figure 41D). Cela signifie que la survie ou la prolifération des PLD dépendent de Mcl-1 et Bcl-xL et que ces protéines peuvent favoriser le processus d'échappement à la sénescence.

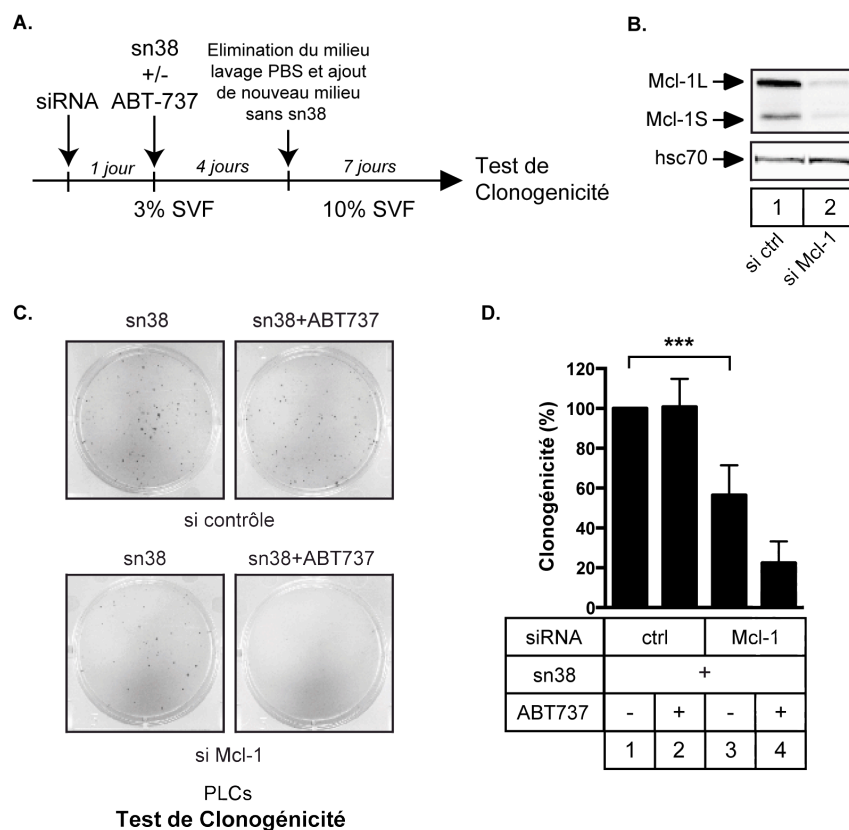


Figure 41 : L'émergence des PLD dépend des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. **A.** Schéma du protocole. **B.** Suite à la transfection du siRNA dirigé contre Mcl-1, la perte d'expression de cette protéine a été validée par western blot (n=3). **C et D.** Pour évaluer le pourcentage de cellules proliférantes (PLD) au sein des PLCs dans les différentes conditions, des tests de clonogénicité ont été réalisés. Des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre Mcl-1 ou un siRNA contrôle ont été traitées pendant quatre jours avec du sn38 en combinaison ou non avec l'ABT737. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du nouveau milieu comme indiqué sur le schéma (A.). Ces différentes conditions ont été décollées puis semées suivant le protocole de clonogénicité. Des photos représentatives (C.) et la quantification (D.) sont présentées (n=3 +/-sd sauf pour la condition siRNA dirigé contre Mcl-1 traitée au sn38 sans ABT737 n=13 +/-sd).

3.2.3.4. La résistance à l'anoikis des PLCs dépend de Mcl-1 et Bcl-xL.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de ces protéines dans la résistance à l'anoikis. La combinaison du traitement sn38 et de l'inhibition de Bcl-xL par l'ABT-737 diminue faiblement mais de façon non significative le nombre de cellules capables de croître en condition de faible adhérence (Figure 42B; pistes 1 et 2, Figure 42C). Lorsque l'inhibition de Mcl-1, par ARN interférence, est réalisée en combinaison avec le traitement sn38, une diminution significative de la croissance dans ces conditions est observée (Figure 42B; pistes 1 et 3, Figure 42C). La combinaison de l'inhibition de Mcl-1 et du traitement ABT-737 augmente cet effet par rapport à l'inhibition de Mcl-1 seule (Figure 42B; piste 1, 3 et 4, Figure 42C). La résistance à l'anoikis, induite par le traitement sn38, dépend donc des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Même si l'inactivation de Mcl-1 semble avoir l'effet majeur, Mcl-1 et Bcl-xL semblent tout de même avoir une action synergique dans l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis.

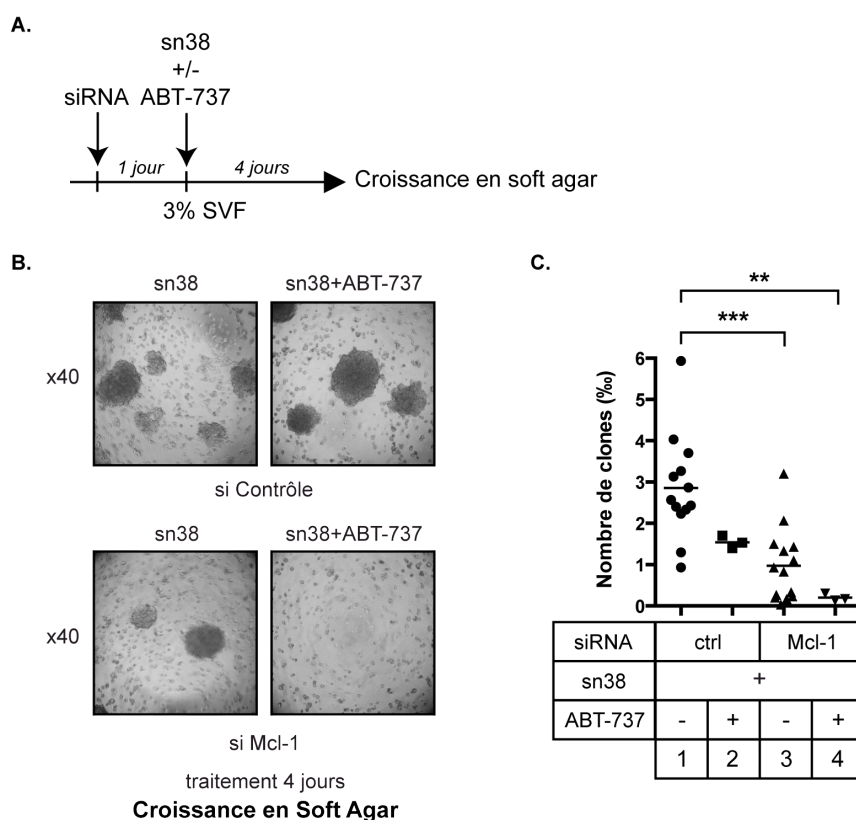


Figure 42 : La résistance à l'anoikis dépend des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. A-C. Des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre Mcl-1 ou un siRNA contrôle ont été traitées pendant quatre jours avec du sn38 en combinaison ou non avec l'ABT737 (A.). La croissance en soft agar a ensuite été évaluée, 10000 cellules sont plantées pour chaque condition. Des photos représentatives (x40) (B.) et le pourcentage de cellules (C.) sont présentées (n=3 +/-sd sauf pour la condition siRNA dirigé contre Mcl-1 traitée au sn38 sans ABT737 n=13 +/-sd)

Pour conclure cette deuxième partie, nous avons vu que les cellules LS174T CD44^{high}, exprimant LGR5 et ayant une activité de l'ALDH voyaient leur pourcentage diminuer suite au traitement par le sn38 et dans les cellules persistantes (Figure 35C). Cela n'exclu pourtant pas que les cellules souches cancéreuses (CSC) aient un rôle dans notre modèle. Dans les cellules LS174T, le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) serait induit de manière transitoire en réponse au sn38 (Figure 36). L'extinction de Slug et Zeb1, fortement induits en réponse au traitement, n'aurait aucun effet sur la résistance à l'anoikis. Cependant, Slug pourrait inhiber l'émergence des PLD (Figure 37). Enfin, nous avons démasqué une sensibilité des cellules traitées à l'inhibition de protéines de survie Mcl-1 et Bcl-xL (Figures 38 et 40). Ces protéines participeraient à l'échappement à la sénescence et à la résistance à l'anoikis observés après le traitement (Figures 41, 42 et 43).

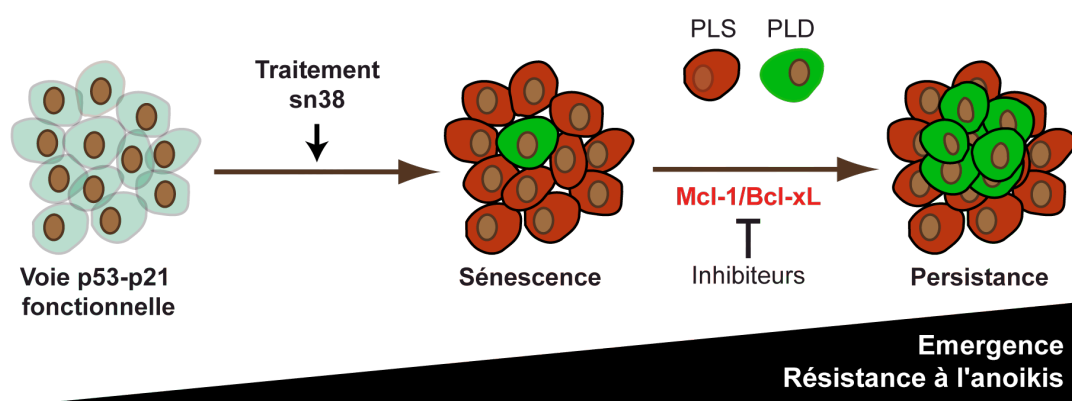


Figure 43 : Mcl-1 et Bcl-xL participent à l'échappement à la sénescence et à l'acquisition de la résistance à l'anoikis suite au traitement par le sn38. Lors du traitement sn38, la majorité des cellules, dont la voie p53-p21 est fonctionnelle, entrent en sénescence. Mais, lorsque les cellules traitées sont stimulées avec du sérum, une petite proportion de cellules sont capables de repopuler (PLD) et constituent, avec les cellules sénescents (PLS), les cellules persistantes (PLCs). Cet échappement à la sénescence est dépendant de Mcl-1 et Bcl-xL. Les cellules traitées avec le sn38 et les PLCs ont une capacité de croissance en condition de faible adhérence qui est augmentée et qui est aussi dépendante de Mcl-1 et Bcl-xL. L'inhibition des protéines Mcl-1 et Bcl-xL pourrait donc abolir cette chimiorésistance et l'agressivité des PLCs.

Les cellules persistantes sont constituées de sous-populations hétérogènes. Nous nous sommes donc demandés, entre les cellules proliférantes (PLD) et les cellules sénescents (PLS) quelles cellules sont dépendantes de Bcl-xL et Mcl-1 et quelles cellules sont responsables de la résistance à l'anoikis. Nous avons donc mis en oeuvre une méthode de séparation de ces deux populations cellulaires.

3.3. Parmi les PLCs, les PLD et les PLS enrichies, expriment de façon différente Mcl-1 et Bcl-xL et n'ont pas la même capacité de croissance en faible adhérence

3.3.1. Les PLCs sont constituées de PLD et de PLS qui peuvent être enrichies selon leur granulométrie et leur taille.

La séparation des cellules sur le critère de la sénescence est assez compliquée. En effet il n'y pas de marqueurs extra-cellulaires connus. Une solution est de séparer les cellules selon leur granulométrie et leur taille. En effet, lors du processus de sénescence la morphologie des cellules change de façon importante (Schmitt, 2007).

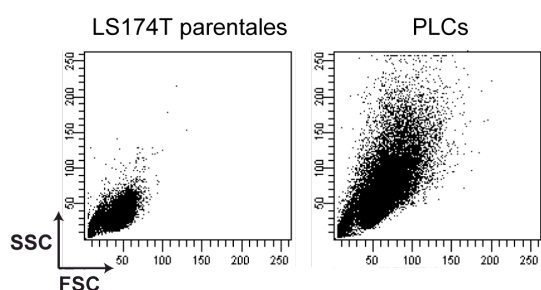


Figure 44 : La granulométrie et la taille des cellules PLCs sont augmentées par rapport aux cellules LS174T parentales. Les cellules LS174T et les PLCs ont été analysées par cytométrie de flux selon les paramètres SSC (granulométrie) et FSC (taille). Des images représentatives de six expériences sont présentées.

Lorsque que l'on compare le profil cytométrique granulométrie (SSC)/taille (FSC) des cellules LS174T parentales et des PLCs, nous observons de façon très nette une augmentation de ces paramètres SSC/FSC (Figure 44). Alors que nos résultats semblent indiquer que les PLD sont des cellules diploïdes et que les PLS sont des cellules tétraploïdes et polyploïdes (Figures 25 et 30), nous avons décidé de séparer les cellules PLD et PLS selon leur profil SSC/FSC. Pour vérifier la pertinence de cette démarche de séparation, nous avons étudié des marqueurs de prolifération et de sénescence dans les sous-populations cellulaires SSC^{low}/FSC^{low} et SSC^{high}/FSC^{high} .

Pour cela, dans un premier temps, nous avons réalisé un marquage de la protéine Ki67 sur la population totale PLCs (Figure 45A). Initialement utilisé en histologie, le marquage de la protéine Ki67 identifie de façon robuste la prolifération, même si le rôle précis de cette protéine n'est pas connu (Brown & Gatter, 2002) (Pathmanathan & Balleine, 2013). Suite au marquage, nous avons sélectionné les deux populations et étudié leur expression de Ki67. Les cellules SSC^{low}/FSC^{low} (en vert) sont bien marquées, ce sont des cellules proliférantes alors que les SSC^{high}/FSC^{high} (en rouge) n'expriment pas ou très peu la protéine Ki67 (Figure 45A). Nous avons ensuite séparé ces cellules pour confirmer cette

observation faite sur la population totale. Les expériences de clonogénicité, réalisées après le tri, révèlent que les cellules SSC^{low}/FSC^{low} sont significativement enrichies en cellules proliférantes (pistes 1 et 2, Figure 45B) et de façon inverse, les cellules SSC^{high}/FSC^{high} sont significativement déplétées en cellules proliférantes (pistes 1 et 3, Figure 45B). Suite au traitement génotoxique, l'arrêt du cycle cellulaire est associé à la perte de l'expression transcriptionnelle de AURKA (Courapied et al., 2010) (C.-C. Wu et al., 2012). Nous avons donc étudié l'expression de ce marqueur et celle de PLK1, une protéine intervenant dans la prolifération qui est également diminuée lors des dommages de l'ADN (McKenzie et al., 2010) (Zhou et al., 2013) (Y.-C. Lin et al., 2014). L'expression transcriptionnelle de AURKA et PLK1 est augmentée significativement dans les cellules SSC^{low}/FSC^{low} par rapport aux cellules SSC^{high}/FSC^{high} (Figure 45C).

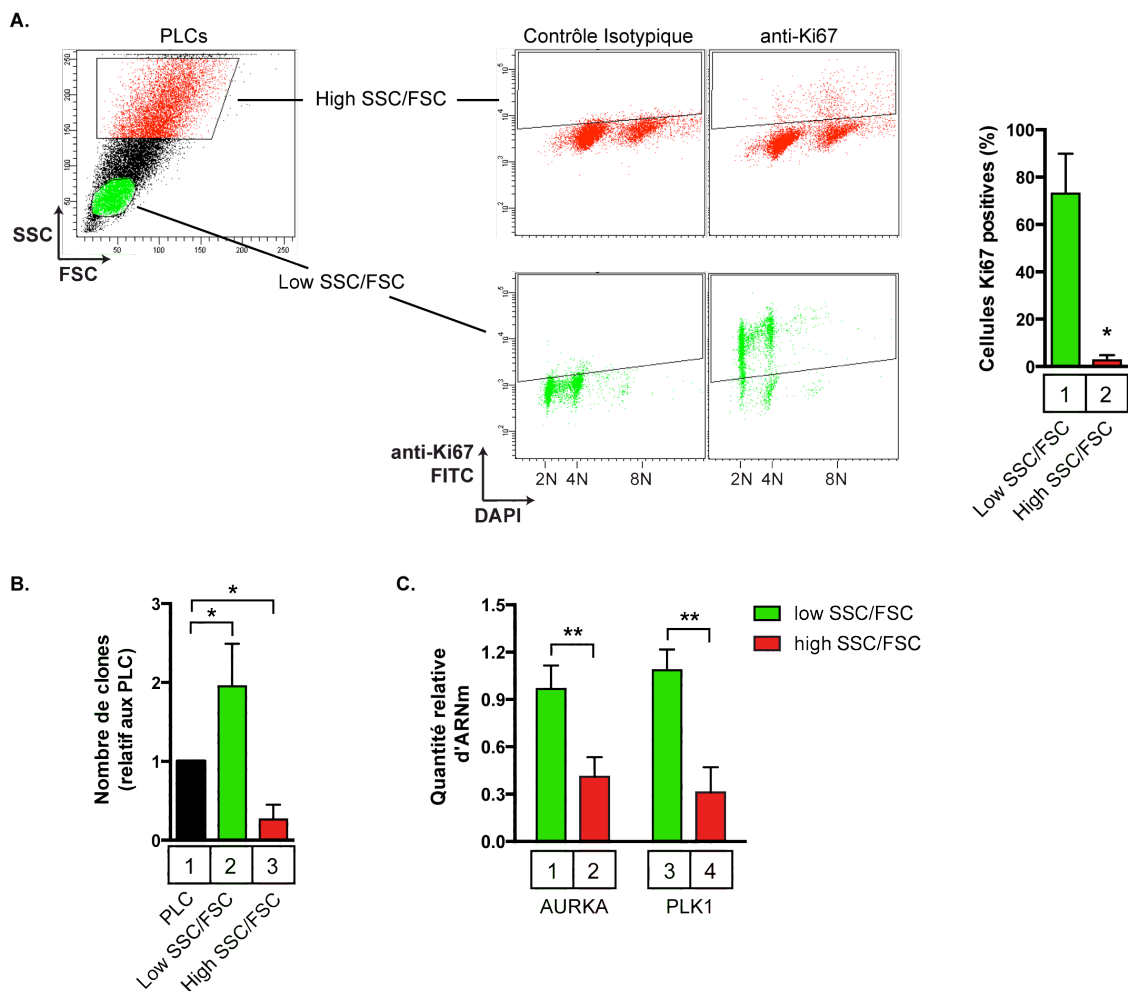


Figure 45 : Au sein des PLCs, les cellules SSC^{low}/FSC^{low} expriment des marqueurs de prolifération. A. La prolifération des PLCs a été évaluée par cytométrie en utilisant un anticorps dirigé contre le Ki67. Nous avons sélectionné les populations SSC^{low}/FSC^{low} et SSC^{high}/FSC^{high} , et leur expression du Ki67 est présentée. Le pourcentage des cellules exprimant le Ki67 est présenté à droite ($n=4\pm$ -sd). **B.** Les capacités prolifératives des cellules SSC^{low}/FSC^{low} et SSC^{high}/FSC^{high} triées ont été évaluées par clonogénicité après tri ($n=4\pm$ -sd). **C.** L'expression transcriptionnelle de AURKA et PLK1 a été évaluée par RT-PCR quantitative dans chaque population après tri ($n=5\pm$ -sd).

Ces résultats valident l'enrichissement des PLD dans la fraction SSC^{low}/FSC^{low} . Nous avons ensuite étudié les marqueurs de sénescence dans les deux populations.

Le marquage de l'activité de la SA- β -galactosidase a été réalisée après le tri sur les deux populations. De façon significative, la fraction de cellules SSC^{low}/FSC^{low} est enrichie en cellules n'ayant pas d'activité SA- β -galactosidase (piste 1 et 2, Figure 46A). L'enrichissement des cellules SSC^{high}/FSC^{high} en cellules sénescentes est observé de manière très significative (piste 1 et 3, Figure 46A). Il faut noter la différence du pourcentage de cellules sénescentes au sein des PLCs entre les résultats présentés sur les Figures 26 et 46 qui sont respectivement de 70 et 55% environ. Contrairement à la Figure 26, dans la Figure 46, les cellules PLCs correspondent à des cellules qui ont été passées dans le trieur, sans critères de tri. Cette procédure a pu diminuer la viabilité de ces cellules et c'est pour cette raison que nous l'avons utilisé comme contrôle.

Nous avons aussi étudié l'expression p21, le médiateur de la sénescence. Dans les cellules SSC^{high}/FSC^{high} , p21 est sur-exprimé par rapport aux cellules SSC^{low}/FSC^{low} uniquement au niveau transcriptionnel (Figure 46B). Le niveau protéique de p21 est identique entre les sous-populations (Figure 46C). A ce temps tardif après l'induction de la sénescence, p21 est exprimé plus faiblement qu'après deux jours de traitement (Figure 46C; pistes 2 et 4, Figure 46D). Dans les PLS constituant les PLCs, la sénescence pourrait être maintenue par p16 comme le suggère une autre étude (Poele et al., 2002).

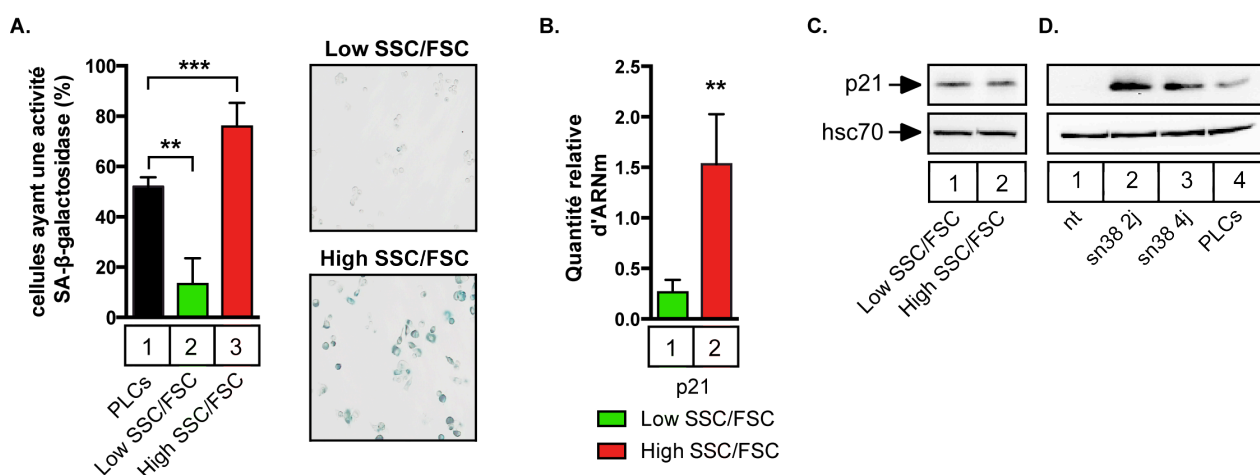


Figure 46 : Au sein des PLCs, ce sont les cellules SSC^{high}/FSC^{high} qui activent la SA- β -galactosidase.

A. Les cellules SSC^{low}/FSC^{low} et SSC^{high}/FSC^{high} ont été triées par cytométrie et le pourcentage de cellules ayant une activité de la SA- β -galactosidase a été évalué pour chaque sous-population ($n=8\pm$ sd). Des photos représentatives sont montrées sur la partie droite de la figure (x100). **B et C.** L'expression transcriptionnelle et protéique de p21 a été évaluée par RT-PCR quantitative (B.) et par western blot (C.) dans chaque population après tri ($n=5\pm$ sd). **D.** L'expression de p21 a été évaluée par western blot sur des extraits totaux de cellules LS174T non traitées, traitées deux et quatre jours et de PLCs ($n=3$).

Les résultats, présentés sur les Figures 45 et 46, nous permettent d'identifier les cellules SSC^{low}/FSC^{low} comme enrichies en PLD et les cellules SSC^{high}/FSC^{high} comme enrichies en PLS. Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation des sous-populations en analysant la ploïdie des PLD et des PLS.

3.3.2. Les PLD sont diploïdes et les PLS sont majoritairement tétraploïdes.

Après un marquage DAPI, nous avons analysé la ploïdie des cellules PLD et PLS enrichies. Comme le suggérait la Figure 30B, les PLD sont diploïdes alors que les cellules PLS sont tétraploïdes et polyploïdes (Figure 47). Lors de l'échappement à la sénescence, les cellules PLD retrouvent une quantité d'ADN proche des cellules parentales. En revanche, les cellules sénescents PLS conservent une ploïdie anormale caractérisée par un pourcentage non négligeable de cellules polyploïdes (Figure 24).

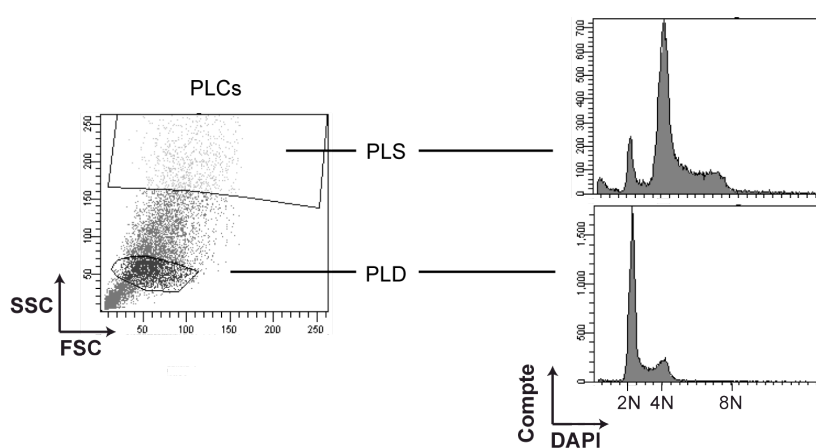


Figure 47 : Les cellules PLD sont diploïdes alors que les cellules PLS sont tétraploïdes et polyploïdes. Après le tri, les cellules PLD et PLS ont été remises en culture. Trois jours après, les cellules ont été marquées avec du DAPI et le profil ADN a été analysé par cytométrie de flux. Des images représentatives de trois expériences sont présentées.

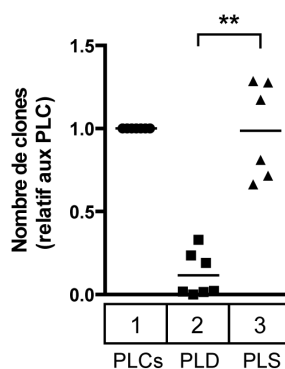
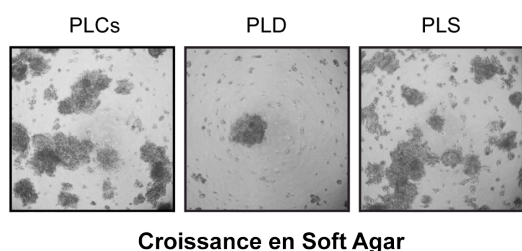
L'hétérogénéité cellulaire au sein des PLCs se traduit également par une hétérogénéité de ploïdie. Les défauts de ploïdie étant associés à l'instabilité génétique et à l'accélération de la tumorigenèse (Davoli & de Lange, 2011), nous avons voulu savoir quelles cellules sont résistantes à l'anoikis au sein des PLCs.

3.3.3. Les PLS enrichies, sont nécessaires à la résistance à l'anoikis.

Comme nous l'avons montré, le traitement génère des cellules capables de pousser dans des conditions de faible adhérence (Figure 32). Cette résistance à l'anoikis est même retrouvée augmentée dans les PLCs. Nous avons voulu savoir quelle sous-population est responsable de cette capacité. Pour les cellules PLCs contrôle du tri, nous obtenons des résultats similaires (pistes 1, Figures 48A et 48B). De façon étonnante, le pourcentage de

cellules PLD capables de pousser dans ces conditions est très réduit comparé à celui des PLCs (pistes 1 et 2, Figures 48A et 48B). Cela signifie que ces cellules ne sont pas capables de croître dans ces conditions lorsqu'elles sont enrichies. A l'inverse, ce sont les cellules enrichies en PLS qui conservent cette capacité de résistance à l'anoikis en agar et en matrigel (pistes 1 et 3, Figures 48A et 48B).

A.



B.

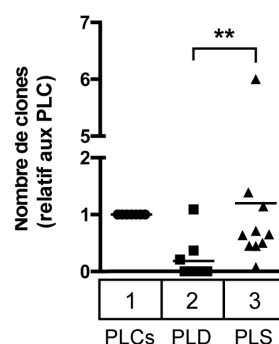
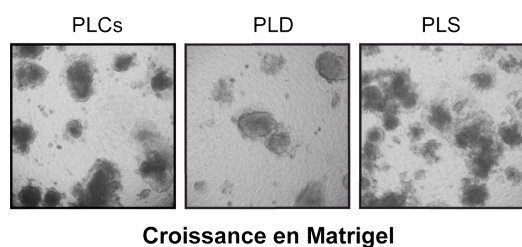


Figure 48 : La présence des PLS est nécessaire à la croissance des PLCs en faible adhérence. A et B.

Après le tri, la croissance des cellules PLCs, PLD et PLS en soft agar (A.) et en matrigel (B.) a été évaluée. 10000 cellules ont été utilisées dans chaque condition. Des images représentatives sont montrées sur la gauche (x40) et la quantification est à droite. Le nombre de clones a été normalisé par rapport à celui de la condition PLCs ($n=6\pm$ -sd pour le soft agar et $n=9\pm$ -sd pour le matrigel).

Comme ce qui est décrit plus haut, cette approche de tri ne génère pas des populations pures mais un enrichissement. Même si ces résultats suggèrent que ce sont les cellules sénescents qui sont capables de résister à l'anoikis, cela reste à confirmer sur un tri plus efficace. Une autre possibilité, plus plausible, serait que les cellules PLD contaminantes, présentes au sein des cellules enrichies en PLS, résisteraient à l'anoikis mais uniquement en présence de cellules PLS (Figures 45, 46 et 47).

Nos résultats montrent que la présence de PLS est nécessaire à la résistance à l'anoikis acquise au cours du traitement sn38. Dans cette étude, nous avons mis en évidence le rôle des protéines Mcl-1 et Bcl-xL dans cette résistance à l'anoikis et aussi dans l'émergence des PLD au sein des PLCs. Nous nous sommes alors demandés quelle population exprime ces protéines de survie.

3.3.4. Les PLD et les PLS expriment de façon différente les protéines Mcl-1 et Bcl-xL

L'expression de Mcl-1 et Bcl-xL a donc été analysée après tri dans chaque sous-population. L'expression de Bcl-xL est plus forte dans les PLS que dans les PLD au niveau transcriptionnel et protéique (pistes 3 et 4, Figure 49A; pistes 1 et 2, Figure 49B). Concernant Mcl-1, elle est retrouvée sur-exprimée dans les PLS au niveau transcriptionnel mais, au niveau protéique, c'est dans les PLD que son expression est la plus élevée (pistes 1 et 2, Figure 49A; pistes 1 et 2, Figure 49B). Ces résultats suggèrent que Bcl-xL et Mcl-1 sont exprimés de manière hétérogène dans les PLCs. La dépendance et la régulation de ces protéines ne seraient donc pas identiques dans les PLS et dans les PLD après le traitement.

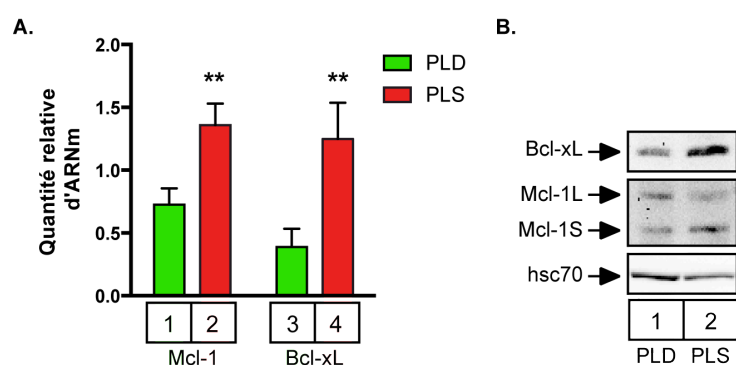


Figure 49 : L'expression de Bcl-xL est plus importante dans les cellules PLS que dans les cellules PLD et inversement pour Mcl-1. A et B. L'expression transcriptionnelle et protéique de Bcl-xL et Mcl-1 ont été évaluées par RT-PCR quantitative (A.) (n=5+/-sd) et par western blot (B.) (n=4) dans chaque population PLD et PLS après tri.

Dans les PLCs, nos résultats suggèrent donc que la résistance à l'anoikis est dépendante des cellules sénescents (Figure 48). La résistance à l'anoikis, observée à quatre jours de traitement, pourrait aussi être dépendante des cellules sénescents qui sont majoritaires à ce temps. Les résultats suggèrent aussi que la survie de ces cellules est dépendante des protéines Bcl-xL et Mcl-1 (Figure 40). Mcl-1 pourrait aussi intervenir dans la survie des cellules PLD. Cela pourrait expliquer la forte diminution de l'émergence des PLD et de la résistance à l'anoikis suite à la perte d'expression de Mcl-1 et à l'inactivation de Bcl-xL conjointes (Figures 41 et 42). Si ces résultats sont vérifiés, cela appuierait aussi la nécessité d'une coopération entre les PLS et les PLD dans l'échappement à la sénescence et la capacité de résister à l'anoikis.

Au vue du rôle des cellules sénescents dans ces phénomènes, nous nous sommes demandés si l'inhibition de p21, qui est connu pour participer au phénotype de sénescence, avait un impact sur l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis observés suite au traitement sn38 (Figure 50).

3.3.5. L'inhibition de p21 limite l'émergence des PLD et la résistance à l'anoikis.

L'expression de p21 a été inhibée par ARN interférence ce qui a été vérifiée par western blot (Figure 50A). L'inhibition de p21, réalisée avant le traitement, induit la diminution du nombre de PLD au sein des PLCs ainsi que la diminution de la croissance en faible adhérence (Figures 50A et 50B). En bloquant l'induction de p21, au moment de la réponse précoce au sn38, les cellules pourraient être sensibilisées à la mort cellulaire lors de la catastrophe mitotique. La sénescence et l'échappement à la sénescence pourraient alors être diminués ainsi que la résistance à l'anoikis, qui dépend des cellules sénescents (Figure 48).

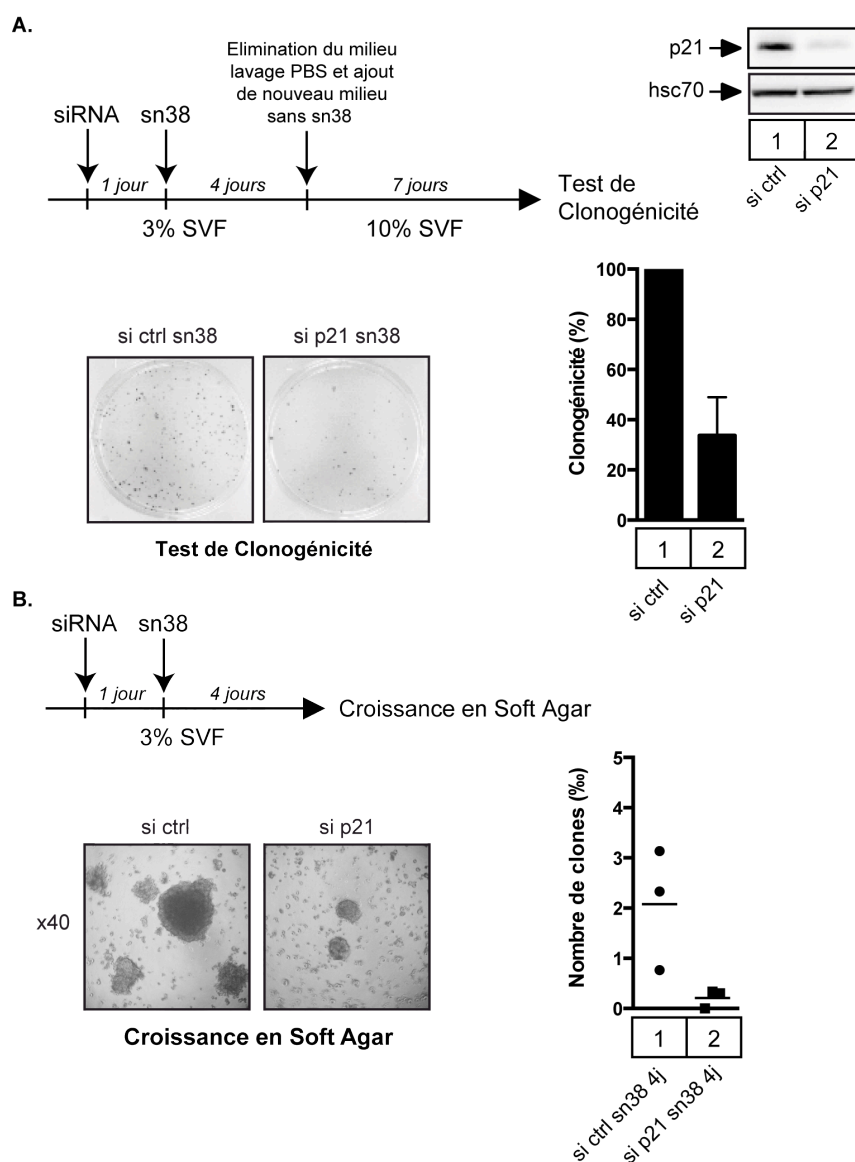


Figure 50 : L'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis dépendent de l'induction précoce de p21 en réponse au sn38. **A.** Comme dans les Figures 37A, 37C et 41 et comme indiqué sur le schéma, des tests de clonogénicité ont été réalisés avec des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre p21 ou un siRNA contrôle. Des photos représentatives sont présentées à gauche et la quantification est présentée à droite (n=3 +/-sd). Suite à la transfection du siRNA dirigé contre p21, la perte d'expression de cette protéine a été validée par western blot (n=3) **B.** Des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre p21 ou un siRNA contrôle ont été traitées pendant quatre jours avec du sn38. La croissance en soft agar a ensuite été évaluée, 10000 cellules ont été plantées pour chaque condition. Des photos représentatives sont présentées à gauche (x40) et le pourcentage de cellules est présenté à droite (n=3 +/-sd).

Pour conclure cette troisième partie, nos résultats suggèrent que, au sein des PLCs, les PLD et les PLS peuvent être enrichies selon leur profil cytométrique SSC/FSC (Figures 44, 45 et 46). Les PLD sont des cellules diploïdes et les PLS sont des cellules majoritairement tétraploïdes (Figure 47). De façon étonnante, ce sont les PLS enrichies qui sont nécessaires à la croissance en faible adhérence (Figure 48). Cependant, il est probable que les PLD contaminantes soient responsables de cette résistance mais que la présence des PLS soit nécessaire. Au sein des PLCs, les PLD expriment un niveau de Mcl-1 plus élevé que les PLS et inversement pour Bcl-xL (Figure 49B). En revanche, l'expression de p21 ne semble pas varier entre les deux populations (Figure 46C). Il est possible qu'à ce temps tardif après l'induction de la sénescence, Mcl-1, Bcl-xL et p21 exercent des rôles différents dans les deux sous-populations, et différents par rapport à l'induction précoce de la sénescence. Dans tous les cas, l'inhibition de ces protéines, combinée au sn38, pourrait améliorer la réponse au traitement et limiter l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis (Figure 51).

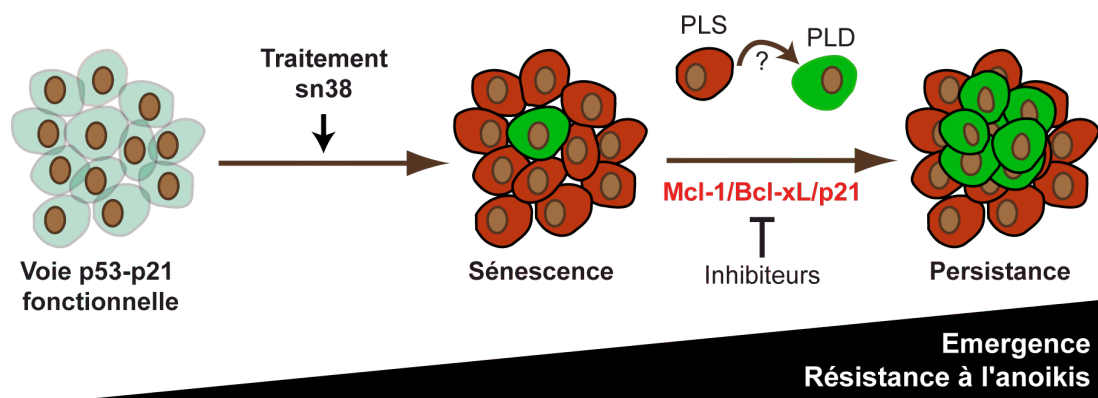


Figure 51 : Mcl-1, Bcl-xL et p21 participent à l'échappement à la sénescence et à l'acquisition de la résistance à l'anoikis en réponse au sn38. Le traitement par le sn38 est associé à l'acquisition de la résistance à l'anoikis. Dans les PLCs, cette capacité est dépendante de la présence des cellules sénescentes mais également des protéines Mcl-1, Bcl-xL et p21. Au niveau précoce, ces protéines pourraient favoriser l'induction de la sénescence, plutôt que l'apoptose. Mais au niveau tardif, elles pourraient être exprimées de façon différentes dans les PLD et les PLS et avoir des rôles différents dans ces deux populations. En combinaison au traitement par le sn38, l'inhibition de ces protéines limiterait l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis.

3.4. Résumé des Résultats obtenus

En réponse au traitement par le sn38, le métabolite actif de l'irinotécan, différents types de réponse sont observés dans les lignées cellulaires HT29, HCT116 et LS174T : l'apoptose ou la sénescence (Figures 24 et 25). Lorsque les cellules LS174T traitées sont stimulées avec du sérum, des cellules échappent à la sénescence (Figures 26 et 27). La coexistence entre des cellules proliférantes (PLD) et des cellules sénescents (PLS) est alors observée (Figures 26, 27 et 28). Nous avons qualifié l'ensemble de ces cellules de cellules persistantes (PLCs). Ce phénomène de persistance interviendrait aussi en réponse à l'oxaliplatine (Figure 29). Au cours de l'échappement à la sénescence, les cellules n'acquièrent pas de résistance au sn38, cependant, le traitement augmente leur capacité à résister à l'anoikis (Figures 31 et 32). Alors que les marqueurs des CSC sont diminués en réponse au traitement, les marqueurs du mécanisme de transition épithélio-mesenchymateuse, Slug et Zeb1, ne semblent pas impliqués dans la capacité de croissance en faible adhérence (Figures 33 à 37). En revanche, nos résultats montrent que la survie des cellules traitées est dépendante des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL. Nous avons également mis en évidence l'implication de ces protéines dans l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis (Figures 38 à 42). Pour étudier l'implication respective des PLD et des PLS dans cette résistance, nous avons séparé ces deux populations selon leur profil cytométrique granulométrie/taille (SSC/FSC) (Figures 43 à 47). Les résultats des expériences, faites à partir des populations enrichies, révèlent que la résistance à l'anoikis est dépendante de la présence des cellules PLS (Figure 48). Au sein des PLCs, les PLS sur-expriment Bcl-xL et les PLD expriment Mcl-1 (Figure 49). p21, le médiateur de la sénescence, apparaîtrait aussi comme requis pour l'échappement à la sénescence et la résistance à l'anoikis. Son expression est faible dans PLD et le serait également dans les PLS (Figure 50). Nous avons identifié les protéines Mcl-1, Bcl-xL et p21 comme des facteurs impliqués dans la chimiorésistance en réponse au sn38. En favorisant la survie et/ou la génération des cellules PLD et PLS, ces protéines seraient responsables de l'émergence des PLD au sein des PLCs et de la résistance à l'anoikis. La régulation différentielle de l'expression de Mcl-1, Bcl-xL et p21 dans les sous-populations de PLD et PLS pourrait favoriser la coopération de ces deux sous-populations dans la rechute et dans l'agressivité tumorale suite à la chimiothérapie.

Ces travaux font l'objet d'une publication soumise au journal Oncotarget depuis le 22 septembre 2014 et présentée ci-dessous.

3.5. Publication soumise

De : editors@oncotarget.com

Objet : 001656 Receipt of New Paper by oncotarget

Date : 22 septembre 2014 13:14:43 HAEC

À : olivier.coqueret@univ-angers.fr

Cc : editors@oncotarget.com

Répondre à : editors@oncotarget.com

Dear Olivier Coqueret,

On September 22, 2014, Oncotarget Journal received your manuscript entitled "Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1" by Barbara Jonchère, Alexandra Vétillard, Bertrand Toutain, David Lam, Anne-charlotte Bernard, Cecile Henry, Sophie De Carné Trécesson, Erick Gamelin, Philippe Juin, Catherine Guette, and Olivier Coqueret.

Your manuscript has been assigned the Paper #: 001656.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

[http://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?
el=A2JC3mA2A1GQo4F5A9ftdoo24C3fGEhUxJDrfU0MabQZ](http://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2JC3mA2A1GQo4F5A9ftdoo24C3fGEhUxJDrfU0MabQZ)

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your work to the Oncotarget.

Sincerely,

Staff

Oncotarget Journal

Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1

Barbara Jonchère¹, Alexandra Vétillard¹, Bertrand Toutain¹, David Lam¹, Anne Charlotte Bernard¹, Cécile Henry¹, Sophie De Carné Trécesson², Erick Gamelin¹, Philippe Juin^{2,3}, Catherine Guette¹ and Olivier Coqueret¹

¹ Paul Papin ICO Cancer Center, INSERM U892, CNRS 6299, Angers University, Angers, France

² INSERM U892, CNRS 6299, Nantes University, Nantes, France

³ Gauducheau ICO Cancer Center, INSERM U892, CNRS 6299, Nantes, France

Correspondence to: Olivier Coqueret, **email:** olivier.coqueret@univ-angers.fr

Keywords: Chemotherapy, senescence, irinotecan, drug resistance, colorectal cancer.

Received: September 10, 2014

Accepted: November 06, 2014

Published: November 06, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Induction of senescence by chemotherapy was initially characterized as a suppressive response that prevents tumor cell proliferation. However, in response to treatment, it is not really known how cells can survive senescence and how irreversible this pathway is. In this study, we analyzed cell escape in response to irinotecan, a first line treatment used in colorectal cancer that induced senescence. We detected subpopulations of cells that adapted to chemotherapy and resumed proliferation. Survival led to the emergence of more transformed cells that induced tumor formation in mice and grew in low adhesion conditions. A significant amount of viable polyploid cells was also generated following irinotecan failure. Markers such as Igr5, CD44, CD133 and ALDH were downregulated in persistent clones, indicating that survival was not associated with an increase in cancer initiating cells. Importantly, malignant cells which resisted senescence relied on survival pathways induced by Mcl-1 signaling and to a lesser extent by Bcl-xL. Depletion of Mcl-1 increased irinotecan efficiency, induced the death of polyploid cells, prevented cell emergence and inhibited growth in low-adhesion conditions. We therefore propose that Mcl-1 targeting should be considered in the future to reduce senescence escape and to improve the treatment of irinotecan-refractory colorectal cancers.

INTRODUCTION

Conventional genotoxic treatments induce cell death through apoptosis or senescence, a long term cell cycle exit where cancer cells remain viable but proliferation is definitely arrested. This response relies on the p53-p21waf1 and p16INK4-Rb pathways that prevent cell cycle progression and lock E2F-responsive genes in an inactive stage. Initially characterized in primary cells, animal models and human biopsies have demonstrated that senescence limits tumor progression and is necessary for a chemotherapy response [1-5]. Cell cycle arrest and senescence should be distinguished [6], first because senescent cells lose definitely their replicative potential,

which is not always the case during the inhibition of cell cycle progression. In addition, senescence is also viewed as a consequence of cell cycle arrest that occurs when cells are overwhelmed at the same time by growth-promoting pathways and inappropriate mTOR signaling [7-10].

In response to treatment, it is however unclear if senescence is always irreversible and why or how some cells preserve their proliferative potential in response to this suppressive mechanism. Theoretically, clones can exit senescence by the acquisition of secondary mutations such as p53 inactivation, but this is difficult to reconcile with the absence of proliferation of treated cells. Interestingly, several studies have reported non mutational mechanisms of drug resistance. For instance, a small subpopulation of

«cancer-initiating cells» (CICs) endowed with an intrinsic drug resistance program represents a major source of therapeutic failure in breast cancer [11-13]. These initiating cells exist in a dynamic equilibrium with a differentiated counterpart, they auto-regenerate and thus reconstitute a complete population in response to stressful conditions [14]. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in this phenotypic adaptation through the conversion of epithelial to mesenchymal cells endowed with CIC properties [11, 15-17]. In lung cancer, subpopulations of persistent cells can also resume proliferation when the majority of the population dies in response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. This has been associated with an altered chromatin state mediated by the RBP2/KDM5A/Jarid1A histone demethylase [18]. Such adaptive and reversible mechanisms have also been described in bacteria where the rate of switching between sensitive and resistant bacteria explains how a total population can ultimately be reconstituted when antibiotic treatment is released [19].

We have recently shown that senescence escape and persistence also occur in colorectal cancer in response to the oncogenic stress mediated by Rasv12 [20]. Persistence was associated with p21waf1 down-regulation, increased genomic instability and with a dependency on Bcl-xL/Mcl-1 prosurvival signaling. In the current study, we pursued these experiments on senescence escape in response to chemotherapy. In unresectable metastatic colorectal cancer, irinotecan is used as a first or second line treatment in the FOLFIRI (leucovorin/5-FU/irinotecan) regimen. Unfortunately, tumor progression occurs generally rapidly [21], indicating that some cells can adapt to this topoisomerase I inhibitor. Several resistance mechanisms have been described, such as drug transport and metabolism, enhanced DNA repair and compensatory feedback pathways [22]. In this study, we described that a small population of cells can escape senescence and adapt to irinotecan treatment. Emerging within an heterogeneous population, persistent cells appeared to be more transformed and invasive than the parental population because they acquired the ability to grow in low-adherence conditions and to proliferate within a matrigel matrix. Interestingly, these cells show dependence on Mcl-1 signaling, probably as a consequence of pro-apoptotic pathways activated during senescence resistance.

Therefore, although chemotherapy killed off the vast majority of the initial population, some cells resist to this treatment and afterwards emerge as more aggressive cells. Besides the acquisition of secondary mutations, we propose that this adaptation mechanism plays an important role in the response failure of colorectal cancer to topoisomerase I inhibitors.

RESULTS

Various cell outcomes in response to topoisomerase I inhibition

To determine whether colorectal cells can tolerate chemotherapy, three different cell lines were treated with sn38, the active metabolite of irinotecan. LS174T and HCT116 cells express a functional p53-p21 signaling pathway and HT29 cells were used as an example of cells expressing an inactive form of the p53 tumor suppressor. Using first clonogenic assays, we observed that LS174T and HCT116 have equivalent sensitivity to the topoisomerase inhibitor whereas HT29 cells were slightly more resistant (Figure 1A). sn38 was then used at 5 ng/ml because this concentration prevented cell proliferation of the three cell lines in clonogenic conditions. Note that pharmacokinetic studies have shown that this also corresponds to the plasma concentration of sn38 [23]. Using HT29 as a first experimental model, we observed that cells arrested after two days of treatment with a 4N DNA content and then entered apoptosis as evidenced by the presence of subG1 cells and caspase 3 activation (Figure 1B). This was expected since apoptosis is the main response to DNA damaging drugs when p53 is inactivated [24-27]. These experiments were then repeated in HCT116 and LS174T cells that express a functional p53-p21 pathway. As expected, the p21waf1 cell cycle inhibitor was expressed in both cell lines in response to sn38 and senescence was induced, as evidenced by standard beta-galactosidase assays (Figure 1C). By contrast, caspase 3 or the presence of subG1 cells were not detected in these conditions (data not shown). We then focused on these two cell lines.

Although senescence is considered as a definitive arrest of cell proliferation, how cells escape this suppressive mechanism in response to chemotherapy has not been explained in detail. To determine if/how some cells preserve their proliferative capacities in response to senescence-inducing treatments, LS174T and HCT116 cells were stimulated with 10% serum after 4 days of sn38 treatment (see Figure 2A). The ability to proliferate was then evaluated by clonogenic assays, in untreated cells, after 4 days of treatment or in surviving cells (day 11) and representative images are presented Figure 2B. After 11 days, results showed that some LS174T clones resumed proliferation whereas most HCT116 cells remained essentially arrested at that time (Figure 2B). LS174T clones that emerged from senescence will be named persistent LS174T cells (PLCs). Visual microscopic analysis showed that PLCs emerged as a mixed subpopulation of cells that were either arrested or proliferating (Figure 2C, see also below Figure 7 for KI67 staining). Beta-galactosidase staining indicated

that around 70% of PLCs were still senescent, whereas 20-30% of the total population had restarted proliferation at that time (Figure 2D). Clonogenic tests showed that PLCs divided less efficiently than parental LS174T cells (Figure 2E). To extend this observation, PLCs were injected subcutaneously in immunocompromised mice and their ability to form tumor was compared to that of parental LS174T cells. Surprisingly and despite the fact that PLCs were composed of 70% senescent cells, tumor formation was equivalent between parental cells and

PLCs (Figure 2F). We then questioned whether we had selected clones that possessed an intrinsic resistance to the treatment. Clonogenic tests were performed to compare the sensitivity of the persistent cells to the parental LS174T population. Results indicated that PLCs had the same sn38 IC50 sensitivity as compared to the parental population (Figure 2G). Note however that differences in proliferation rate (Figure 2E) and drug sensitivity (Figure 2G) are difficult to interpret due to the presence of different populations within the PLCs.

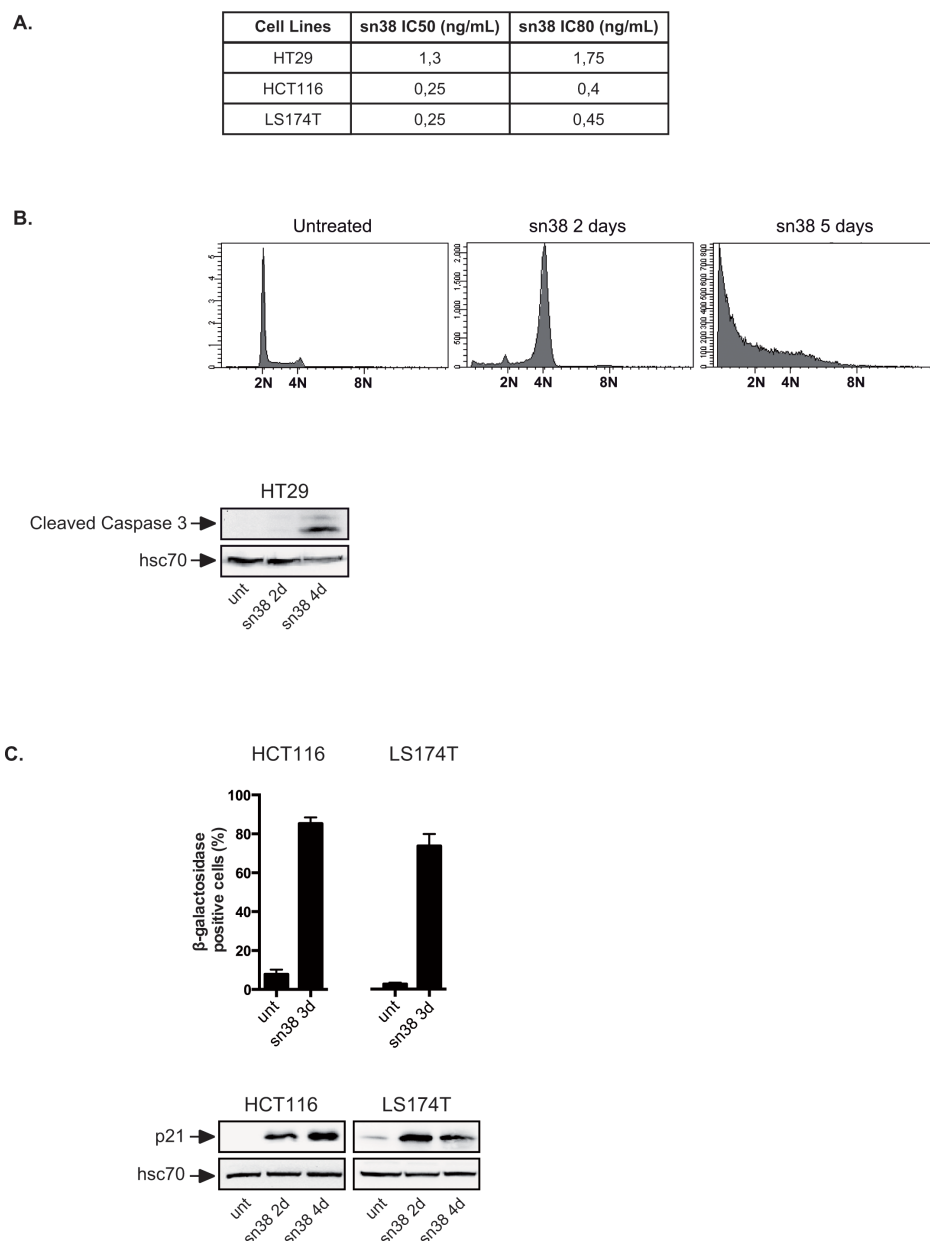


Figure 1: Topoisomerase I inhibition leads to apoptosis or senescence. A. Clonogenic assays of colorectal HT29, HCT116 and LS174T cells. Cells have been treated with different doses of sn38 for 7 to 10 days and colony formation was then counted using crystal violet coloration. For each cell line, the growth of non treated cells was set up at 100% and IC50 and IC80 doses were determined (n=3). B. HT29 cells have been stimulated or not with sn38 (5ng/ml) for the indicated times and flow cytometry experiments were performed to quantify the number of subG1 cells using DAPI staining. In parallel, total cell extracts were recovered and caspase 3 activation was evaluated by western blot analysis (n=2). C. HCT116 and LS174T have been stimulated or not by sn38 (5ng/ml) as indicated. The percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA-βgal activity (n=3 +/- sd) and evidenced by the expression of p21waf1 by western blot.

Altogether, these results indicate that colorectal cells respond to topoisomerase I inhibition with different outcomes, entering either apoptosis or senescence. Among these, a subpopulation of LS174T cells can survive and emerge within an heterogeneous subpopulation to resume proliferation and form tumors *in vivo*.

sn38 treatment induced the appearance of cells that resist to anoikis

We were intrigued by the fact that PLCs induced *in vivo* tumor formation to the same extent as parental cells despite the fact that they were essentially composed of senescent cells. We therefore determined if sn38

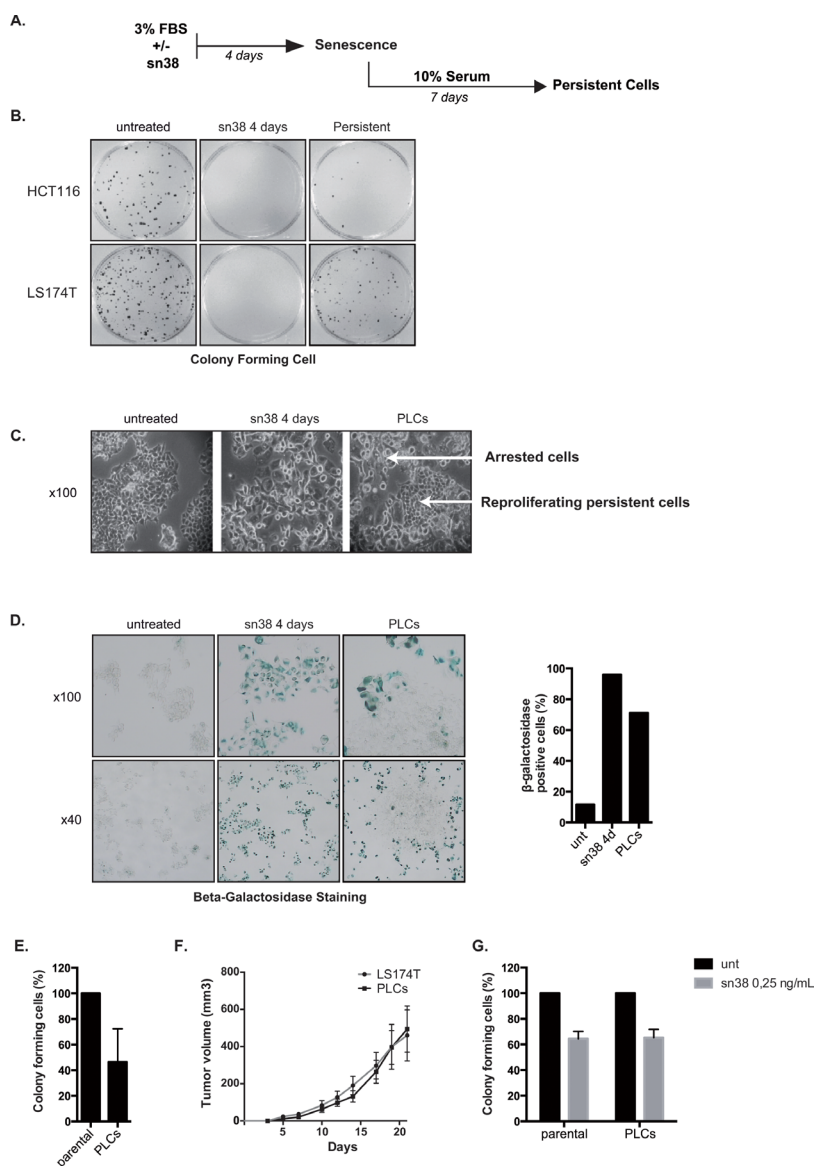


Figure 2: Cell emergence following sn38 treatment. A. Experimental procedure to generate persistent cells. Cells have been treated or not with sn38 (5ng/ml) in 3% FBS for 4 days and then further stimulated with 10% FBS for 7 days to reinduce cell growth in the absence of drug. To measure cell proliferation, clonogenic assays were then performed using either untreated cells, cells treated for 4 days or persistent cells. B. Representative images of the proliferation capacity of the different cells. Untreated cells, cells treated for 4 days with sn38 and persistent cells were recovered and analyzed using clonogenic assays (representative image of three experiments). C. Representative images of PLCs heterogeneity. Note the emergence of islets of proliferating cells in PLCs (KI67 staining is presented Figure 7, representative image of four experiments). D. Representative images of cells expressing SA- β gal activity in untreated cells, after 4 days of treatment or in PLCs. Quantification of one representative experiment is shown on the right. E. The proliferative capacity of parental LS174T cells and PLCs was quantified by clonogenic test (n=3+/-sd). F. *In vivo* evaluation of tumor formation by parental LS174T cells or PLCs. Cells were injected subcutaneously in immunocompromised mice and the tumor volume was monitored during twenty days (6 mice were used per condition in each experiment). G. sn38 sensibility of parental LS174T cells and of PLCs was evaluated by clonogenic assays using IC50 concentration (n=3+/-sd).

escape induced the emergence of cells that were more transformed and aggressive than parental cells. Using serine 139 phosphorylation of histone gamma-H2Ax as a marker of DNA double strand breaks, we observed by flow cytometry that sn38 induced DNA damage after two days as expected (Figure 3A). H2Ax phosphorylation returned to basal levels in PLCs, suggesting that DNA repair occurred efficiently. However, a significant amount of polyploid LS174T cells was detected after two days (Figure 3B), and these cells remained viable since they were detected after 4 days and in the PLCs (Figure 3C). To determine if these abnormal cells were dividing, clonogenic assays were performed using PLCs and DNA content was analyzed by FACS at the end of the assay (see Figure 3D). Cells with polyploid DNA were not detected at the end of the clonogenic tests, indicating that these cells are probably growth arrested within the heterogeneous PLC population (Figure 3D).

We then used growth in soft agar as an indicator of anoikis resistance and increased cell transformation. To this end, cells were grown in 3% FBS for four days in the presence or absence of sn38, cells were then trypsinized, transferred to soft agar and further grown for 10-20 days. We observed in this condition that the survival of parental LS174T cells was significantly reduced (see materials and methods). By contrast, a subpopulation of sn38-treated cells was able to grow in soft agar after 4 days of treatment (Figure 3E). PLCs were also able to survive in these low-adhesion conditions. Since the same number of cells were plated in soft agar as compared to parental cells, this result indicates that abnormal cells were generated during the early response to sn38 and that they were not pre-existent. These experiments were then repeated using a Matrigel matrix where parental LS174T cells were not able to survive. Again, a subpopulation of cells was able to proliferate and invade this matrigel matrix during the early response to sn38 (Figure 3F).

Therefore, we concluded from these results that following sn38 treatment, a small subpopulation of LS174T persistent cells emerged as more transformed cells that were able to grow in low-adhesion conditions.

Salinomycin increased the number of PLC and anoikis resistance

Chemotherapy escape has been associated with the survival of a subpopulation of cancer initiating cells (CIC) that possess an intrinsic resistance to genotoxic treatment. Using a chemical screen, Gupta et al. have recently identified drugs such as salinomycin that specifically kill these initiating cells [28]. Combinatorial therapy targeting at the same time CICs and differentiated cancer cells are expected to be more efficient than chemotherapy alone [13, 29]. If CICs allowed survival and PLCs emergence, we reasoned that salinomycin should improve the

efficiency of sn38. To verify this hypothesis, we added salinomycin together with sn38 at the beginning of the treatment and cell emergence was then evaluated (see Figure 4A). Surprisingly, results showed that salinomycin significantly enhanced the number of proliferating PLCs (Figure 4B) and the number of cells growing in soft agar (Figure 4C).

We then determined whether salinomycin effectively reduced the expression of the main proposed markers of colorectal cancers stem cells, LGR5, CD133, CD44 and ALDH [30, 31]. Using flow cytometry, a decrease of CD44^{high} and LGR5 expression was observed in response to salinomycin. No significant effect was noticed on CD133 expression and ALDH activity (Figure 4D). We then analyzed the expression of CD44, LGR5, CD133 and ALDH activity in PLCs. Results presented Figure 4E indicate that these markers were down-regulated in the persistent cells.

Altogether, these results indicate that senescence escape and persistence were not associated with an increase in cancer initiating cells. In addition, salinomycin, although known to target breast CICs, presented unexpected effects in colorectal cells when added with sn38, by increasing the proportion of cells that were able to resist and grow in soft agar.

Mcl-1 and Bcl-xL prevented cell death during the early response to sn38

We have recently proposed that Bcl-xL and Mcl-1 allow resistance to oncogene-induced senescence [20]. To determine if PLCs emergence was associated with the induction of anti-apoptotic signals, we analyzed the expression of Bcl-2 pro-survival proteins following acute treatment or in PLCs. Western blot experiments showed that Bcl-2 levels decreased but that Bcl-xL was up-regulated in response to sn38 (Figure 5A). Though we found in a few experiments that Mcl-1 was slightly induced by sn38, its expression was generally not significantly up-regulated. Quantitative RT-PCR experiments showed an early induction at the mRNA levels (Figure 5B). To determine if Bcl-xL and Mcl-1 compensated pro-apoptotic signals, Bax, Puma, Noxa and Bim levels were evaluated since they represent the main targets of Bcl-xL and Mcl-1 [32, 33]. Although we were not able to detect any increase in Bax, Puma and Noxa expressions, a significant up-regulation of Bim was observed in PLCs (Figure 5A and data not shown). These results suggest that pro-apoptotic signals are active in PLCs and that the titration of Bim by survival proteins might be necessary during the process of cell emergence.

We then determined if cell survival relies on the expression of Bcl-xL and/or Mcl-1 during the acute response to sn38. To this end, we used ABT-737, a known inhibitor of the Bcl-2 and Bcl-xL proteins. Cells were

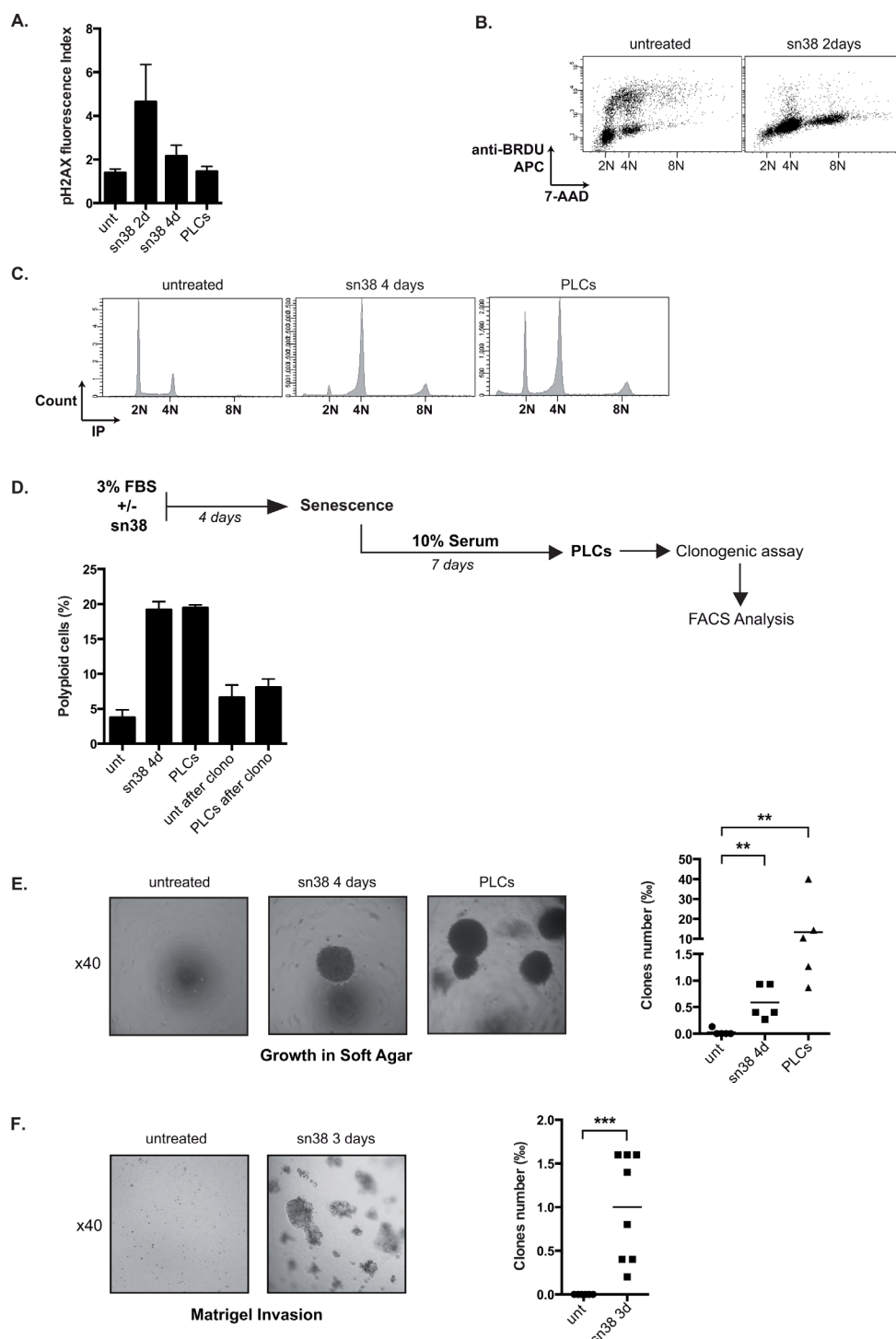


Figure 3: PLCs are more transformed as compared to parental cells. A. DNA damage has been evaluated following treatment and in PLCs by FACS analysis using an antibody directed against the serine 139 phosphorylated form of H2Ax, the mean of fluorescence is presented (n=4 +/-sd). B. LS174T cells have been treated or not with sn38 (5ng/ml) for 48 hrs in the presence of BrdU. Cells were then analyzed for cell cycle distribution by flow cytometry using BrdU labeling and 7AAD staining (representative image of three experiments). C. Vindelov 83 coloration by flow cytometry has been performed to analyze cell cycle profiles and polyploidy in the different conditions (one image is shown, representative of three different experiments). D. Analysis of the proliferative capacity of polyploid cells. LS174T cells treated with sn38 (5ng/ml) for 4 days were further stimulated with 10% FBS for 7 days to reinduce cell growth and generate polyploid cells. Cells were then trypsinized, replated in 10% FBS and allowed to form colonies for 7-10 days. The presence of polyploid cells was then analyzed by flow cytometry, using either parental cells (unt. after clono.) or PLCs for this procedure (PLCs after clono. n=3+/-sd). E and F. Growth of the PLCs was evaluated in soft agar (E) or in matrigel (F), note that 5000 cells were used for these experiments. Representative images are shown (x40) and the number of clones growing in low adhesion has been quantified after 10-20 days (n=5 for soft agar and 8 for matrigel).

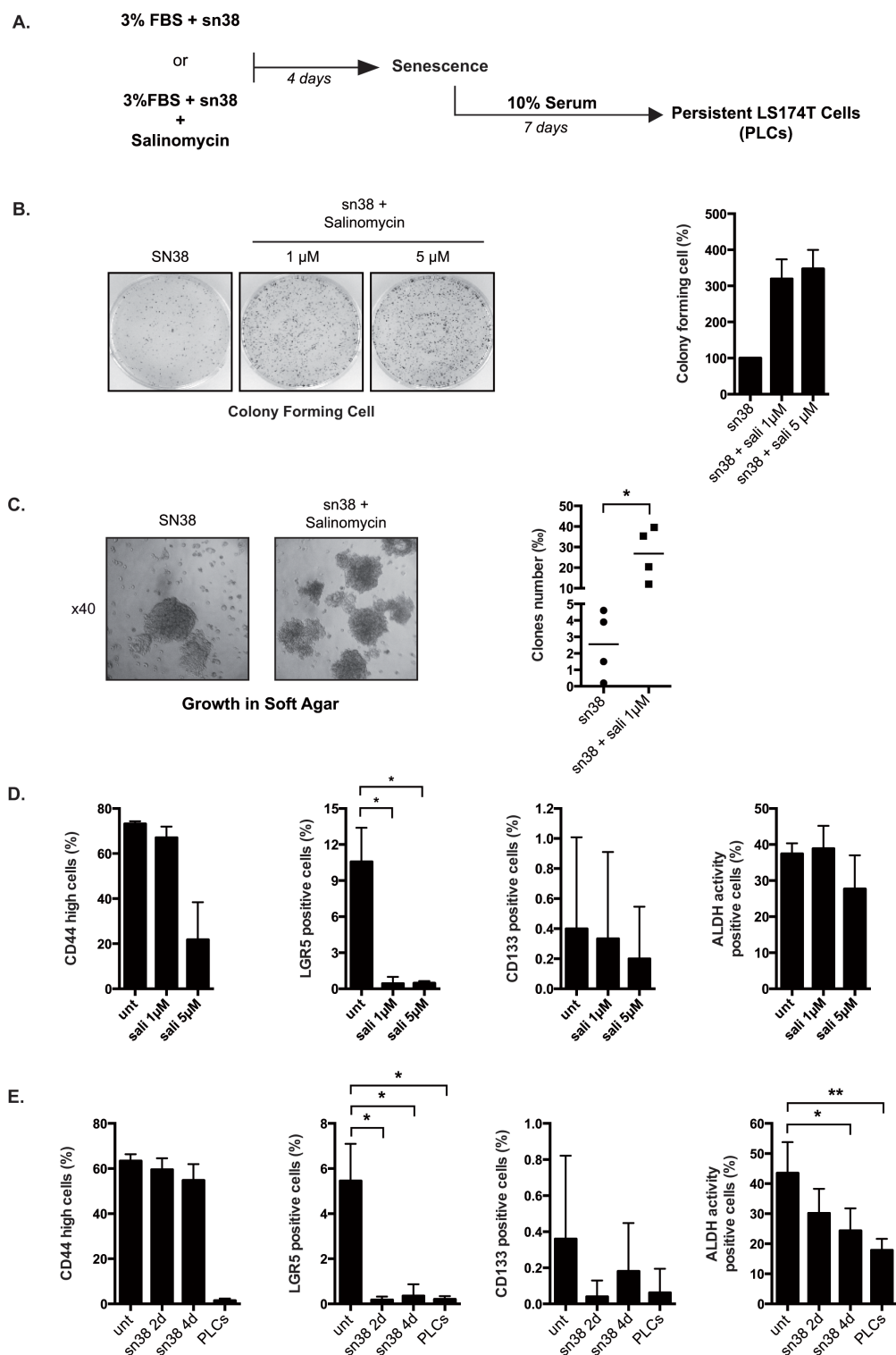


Figure 4: Salinomycin enhances emergence and growth in soft agar. A. Cells have been treated or not with sn38 (5ng/ml) for 4 days in the presence or absence of salinomycin (1 and 5 μ M). Cells were then further stimulated with 10% FBS for 7 days to reinduce cell growth. B. Cells have been treated with sn38 in the presence or absence of salinomycin and the proliferative capacity of PLCs was evaluated by clonogenic tests. Representative images are shown on the left and the quantification of clonogenic results is presented on the right of the figure. Salinomycin was used at 1 μ M (n=3 +/-sd) or 5 μ M (n=2 +/- sd). C. LS174T cells have been treated or not with sn38 and salinomycin (1 μ M) for 3 days. Growth in soft agar was evaluated for 10-20 days. 5000 cells were used in each experiment. Representative images are shown (x40) and the number of clones growing in low adhesion was quantified (n=4). D. CD44^{high}, lgr5, CD133 expressions and Aldh activity have been analysed by flow cytometry following salinomycin treatment of parental LS174T cells for 4 days in 10% FBS. Percentage of positive cells are presented (n=3 +/-sd). E. FACS analysis was performed in cells treated or not with sn38 or in PLCs as indicated (n=3 +/-sd).

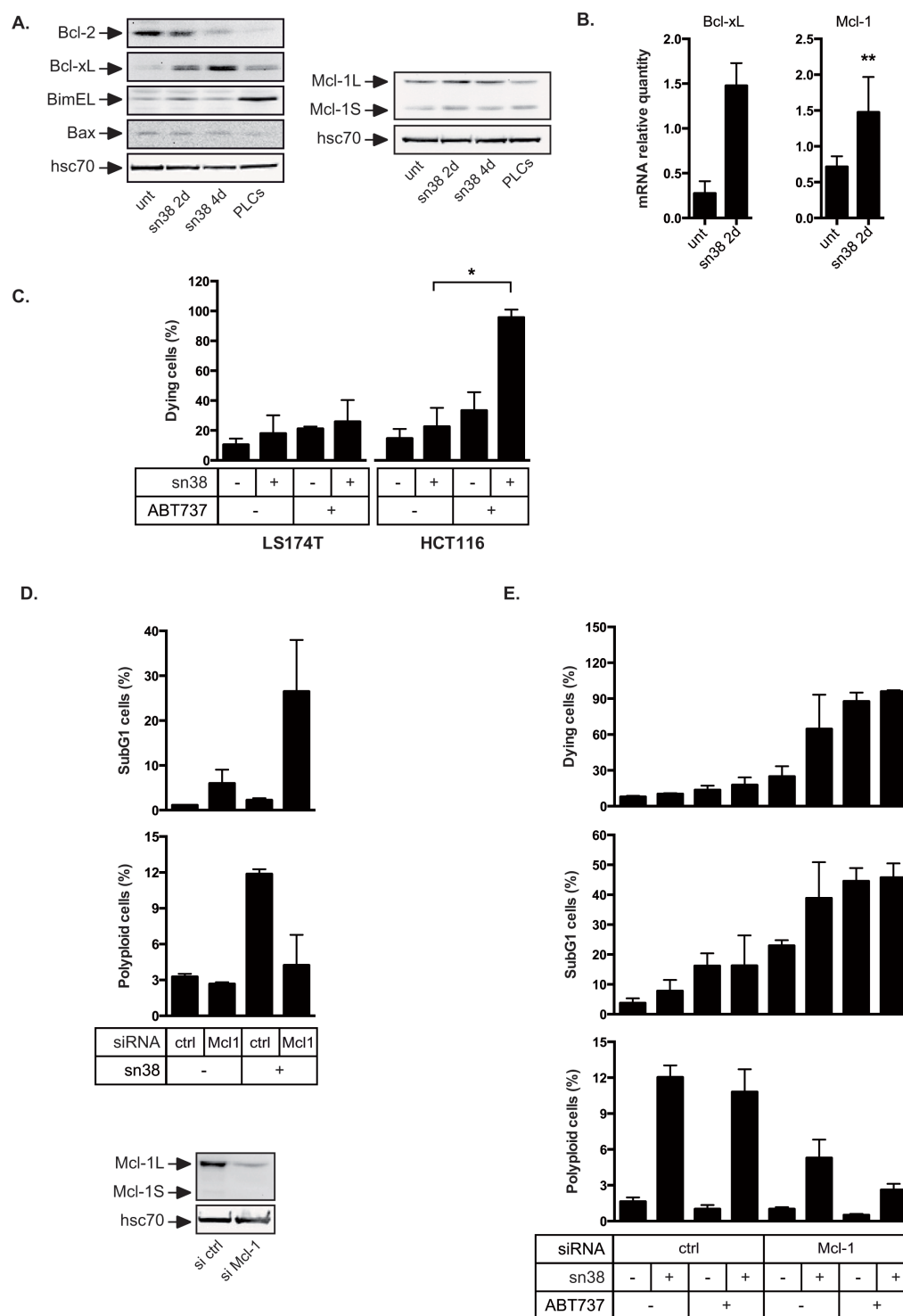


Figure 5: Overexpression of Bcl-xL and Mcl-1 in response to sn38. A. Bcl-xL, Bcl2, Mcl-1, Bim, Bax, and hsc70 expressions have been evaluated by western blot analysis using total cell extracts, following sn38 treatment or in PLCs (n=3). B. The mRNA expressions of Bcl-xL and Mcl-1 have been evaluated by quantitative RT-PCR (n=3 for Bcl-xL and n=5 for Mcl-1). C. LS174T or HCT116 cells have been treated or not by sn38 for 3 days followed by the addition of ABT737 as indicated for 1 day. Cell death was then analyzed by trypan blue exclusion. Note that the early death to sn38 is evaluated here as opposed to long term clonogenic assays shown in Figures 1 and 2 (n=3 +/- sd). D. Mcl-1 expression was down-regulated by RNA interference and 1 day after LS174T cells have been treated with sn38 for 2 days. Cell death was evaluated by flow cytometry analysis through the evaluation of subG1 cells (n=3 +/-sd). In parallel, the percentage of polyploid (>4n) cells has been analyzed (n=3 +/-sd). Mcl-1 down-regulation is shown on the bottom part of the figure. E. Mcl-1 has been down-regulated as described above for 1 day, cells were treated with sn38 for 3 days followed by the addition or not of ABT737 during 1 day. Cell death was evaluated by trypan blue exclusion or subG1 analysis by flow cytometry (n=3 +/-sd). In parallel, the percentage of polyploid cells has been analyzed (n=3 +/-sd).

treated with sn38 for 4 days, in the presence or absence of ABT-737 for the last 24 hours. As visualized by trypan blue exclusion experiments, LS174T cells were not sensitive to ABT-737 (Figure 5C). HCT116 cells, used as a control, demonstrated the efficiency of the Bcl-2 inhibitor since Bcl-xL was also up-regulated in this cell line (data not shown). This suggested that Bcl-xL signaling was not the main survival pathway activated in LS174T cells to allow early sn38 survival. Mcl-1 was then inactivated by RNA interference in this cell line and its down-regulation was verified by western blot analysis (Figure 5D, bottom). Interestingly, Mcl-1 inhibition increased cell death following sn38 treatment as evidenced by the presence of subG1 cells (Figure 5D, top). In addition, this also led to a reduced number of polyploid cells (Figure 5D, middle), suggesting that cells with abnormal DNA content relied on Mcl-1 signaling.

It has been recently shown that the up-regulation of Mcl-1 induced ABT737 resistance [34]. For this reason, we determined if we could enhance cell death by targeting both survival proteins simultaneously. To this end, Mcl-1 was inactivated by RNA interference, and cells were treated with sn38 for 3 days, in the presence or absence of ABT737 for an additional 24 hrs. As visualized by trypan blue exclusion and the analysis of subG1 cells, Mcl-1 inactivation induced cell death and this effect was enhanced by ABT737 to kill almost all cells (Figure 5E). Interestingly, the combination also enhanced the death of polyploid cells as compared to the inactivation of Mcl-1 only (Figure 5E, bottom).

Altogether, these results indicate that Mcl-1 and Bcl-xL are necessary to allow the survival of normal and polyploid cells during the early response to sn38.

Dependency on Bcl-xL and Mcl-1 for anoikis resistance and PLC emergence

If Mcl-1 and Bcl-xL were necessary for the early survival in response to treatment, we reasoned that their inactivation should reduce growth in low adhesion and prevent PLCs emergence. To this end, Mcl-1 was inactivated by RNA interference and cells were then stimulated with sn38 in 3% FBS for 4 days. PLC proliferation was then evaluated as well as the ability to grow in soft agar. In the same experiments, we also tested the effect of the combined inactivation of Mcl-1 and Bcl-xL using ABT-737 (see Figure 6A). Clonogenic tests presented Figure 6B showed that Mcl-1 downregulation significantly reduced the number of proliferating PLCs. This effect was enhanced by ABT737, leading to a further reduction of the number of dividing cells. Mcl-1 inactivation also significantly prevented growth in soft agar as compared to a control siRNA (Figure 6C). Results showed that this effect was enhanced by ABT737, almost completely inhibiting growth in low adhesion (Figure 6C).

Altogether, these results indicate that Mcl-1 and Bcl-xL are necessary to allow PLC emergence and survival in low adhesion conditions.

Senescent cells present within the PLC grew in low adhesion

As described above Figure 2C/D, PLCs were heterogeneous and composed of around 70% senescent cells and 20-30% of proliferating cells. We therefore wanted to determine which subpopulation was able to survive in low adhesion and which cells expressed Mcl-1 and Bcl-xL. Senescent cells are known to increase in size and density as compared to normal counterparts [35]. Using flow cytometry analysis, we effectively detected increased cell size (forward scatter, FSC) and granularity (side scatter, SSC) in PLCs as compared to normal LS174T cells (Figure 7A). In addition, using FSC/SSC gating and KI-67 staining as a marker of cell proliferation, we noticed that a high FSC/SSC profile was associated with a significant decrease in KI-67 expression (Figure 7B). This suggested to us that this large subpopulation might contain the senescent cells. To test this hypothesis, PLC were sorted according to cell size and granularity and senescence was analyzed on each subpopulation using beta-galactosidase assays. Results presented Figure 7C indicated that 75,9% \pm 8,8 cells with a high FSC/SSC profile stained positively for beta-galactosidase, whereas only 13,3% \pm 10,2 cells with a low size and granularity were positive. Using RT-QPCR experiments, we also noticed that the former subpopulation overexpressed p21waf1 mRNA as compared to cells that had a lower FSC/SSC profile. On the opposite, these smaller non-senescent cells expressed higher level of Aurora-A and polo-like kinase 1 mRNAs, two mitotic kinases that we and other have shown to be downregulated in response to genotoxic treatments (Figure 7D) [36, 37]. Following cell sorting, clonogenic tests were then performed to evaluate the proliferative capacity of each subpopulation. Results presented Figure 7E indicated that cells with a low FSC/SSC profile divided more efficiently as compared to cells with a higher profile or to PLCs.

Altogether, these results suggest that we could separate PLCs according to their size and granularity to obtain enriched populations of senescent and dividing cells. The PLCs enriched in dividing cells (low FSC/SSC) will be named PLD whereas those enriched in senescent cells will be named PLS (high FSC/SSC).

Results presented Figure 3C showed that a significant amount of polyploid cells were present within the PLCs. Following cell sorting and DAPI staining, we observed that the cell cycle profile of PLD was normal whereas PLS presented an abnormal polyploid DNA content (Figure 8A). We then compared the growth in soft agar of the two subpopulations. To this end, PLCs were

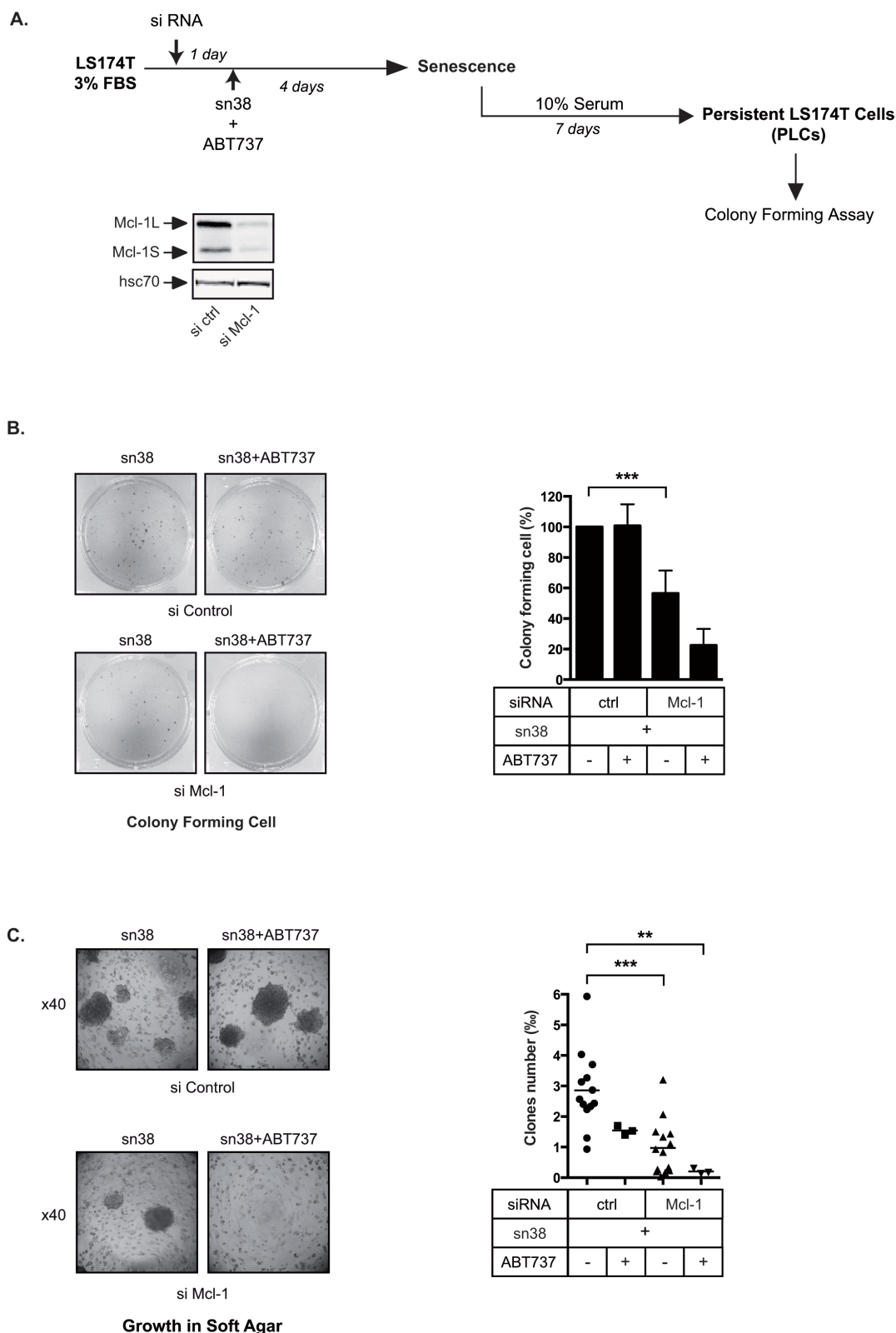


Figure 6: Persistent cells depend on Mcl-1. A. Experimental procedure to inactivate pro-survival proteins during the generation of persistent cells. Mcl-1 expression was down-regulated by RNA interference, 1 day after LS174T cells were treated with sn38 and, where indicated, with ABT737 for 4 days. Emergence and growth in low adhesion were then evaluated. B. Following Mcl-1 inactivation and ABT737 addition as indicated, the proliferative capacity of PLCs was evaluated by clonogenic tests (n=3). Representative images are shown on the left of the figure, and the quantification of clonogenic results are presented on the right (n=3 +/- sd). C. Following Mcl-1 inactivation and ABT737 addition as indicated, treated-cells were recovered after 4 days and grown in soft agar. Representative images are shown on the left of the figure (x40), and quantification results are presented on the right.

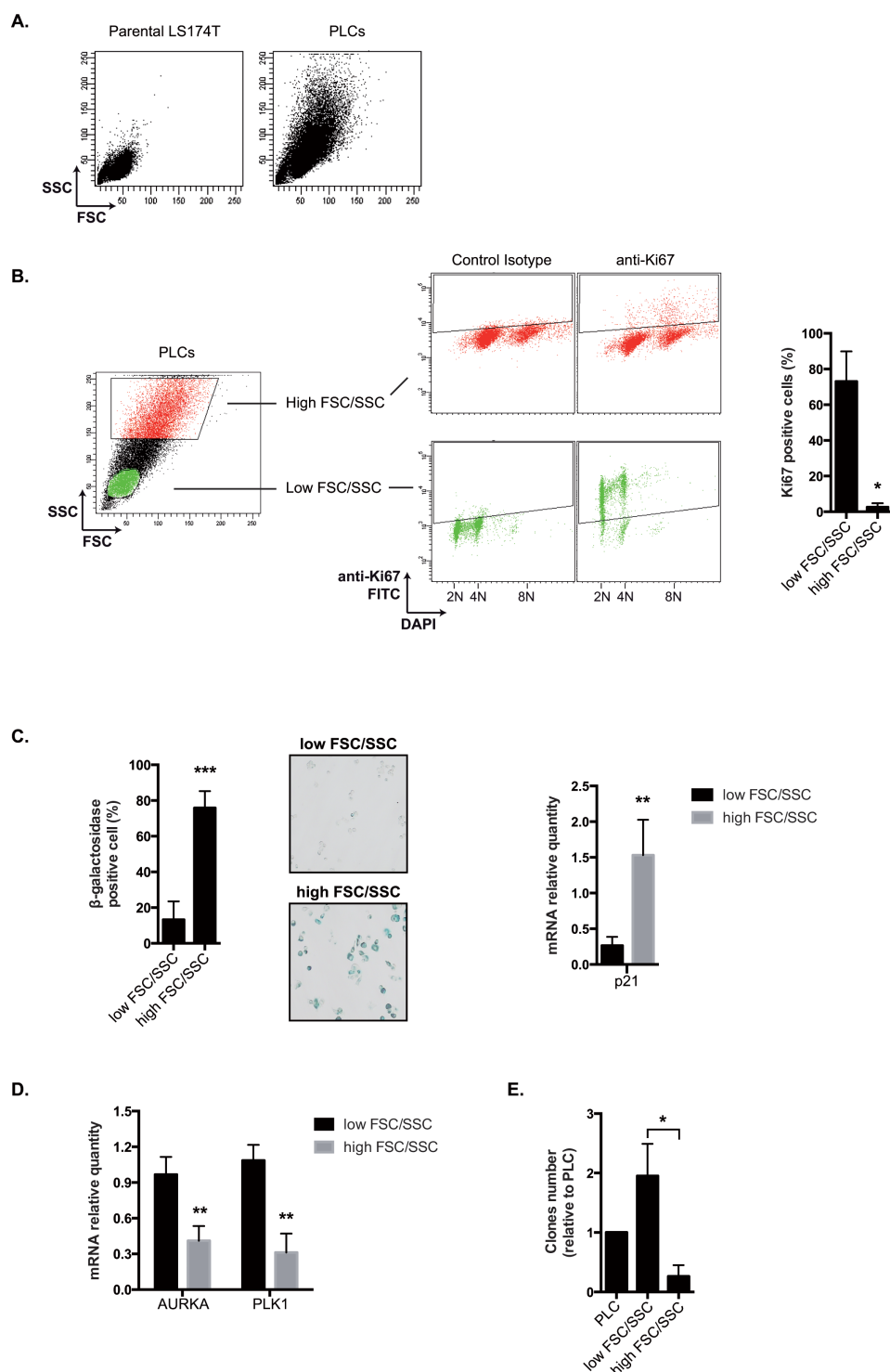


Figure 7: PLCs as a heterogeneous mixture of PLS and PLD cells. A. SSC and FSC parameters have been evaluated by flow cytometry in parental LS174T cells and PLCs (one image representative of 6 experiments). B. Proliferation has been evaluated by flow cytometry using an antibody directed against the Ki67 antigen. Following DNA DAPI staining, cells have been gated according to low or high FSC/SSC values and the corresponding Ki67 expression has been evaluated. Percentages of positive cells are presented on the right part of the figure (n=4+/-sd). C. Cells have been cell sorted by flow cytometry according to low and high FSC/SSC parameters and the percentage of SA-βgal positive cells has been evaluated in each subpopulation (n=8+/-sd). Representative images are shown on the middle part of the figure (x100). p21waf1 mRNA expression has been evaluated by quantitative RT-PCR in each subpopulation (n=5+/-sd). D. Cells have been cell sorted by flow cytometry according to low and high FSC/SSC parameters. Aurora-A and PLK-1 mRNA expressions in each subpopulation have been evaluated by quantitative RT-PCR (n=5+/-sd). E. Cells have been cell sorted by flow cytometry according to low and high FSC/SSC parameters. The proliferative capacity of the two subpopulations and of PLCs was quantified by clonogenic test (n=4+/-sd).

generated, PLD and PLS cells were cell sorted, and the enriched subpopulations were transferred to soft agar and further grown for 10-20 days. In these conditions, PLS cells were able to grow in soft agar whereas the number of growing PLD cells was significantly reduced (Figure 8B). The same observation was made when sorted cells were grown in matrigel. Whereas PLS proliferated within this matrix significantly, less PLD clones were able to grow in these low-adhesion conditions (Figure 8C). We then asked if PLD and PLS expressed to the same extent Mcl-1 and

Bcl-xL. Using RT-QPCR and western blot experiments (Figure 8D), we observed that Bcl-xL was overexpressed in PLS as compared to PLD, both at the mRNA and protein levels. By contrast, Mcl-1L protein levels were slightly overexpressed in the PLD subpopulation.

Therefore, we concluded from these results that the ability to grow in soft agar and in Matrigel is due to the presence of senescent cells within the PLC emergent population.

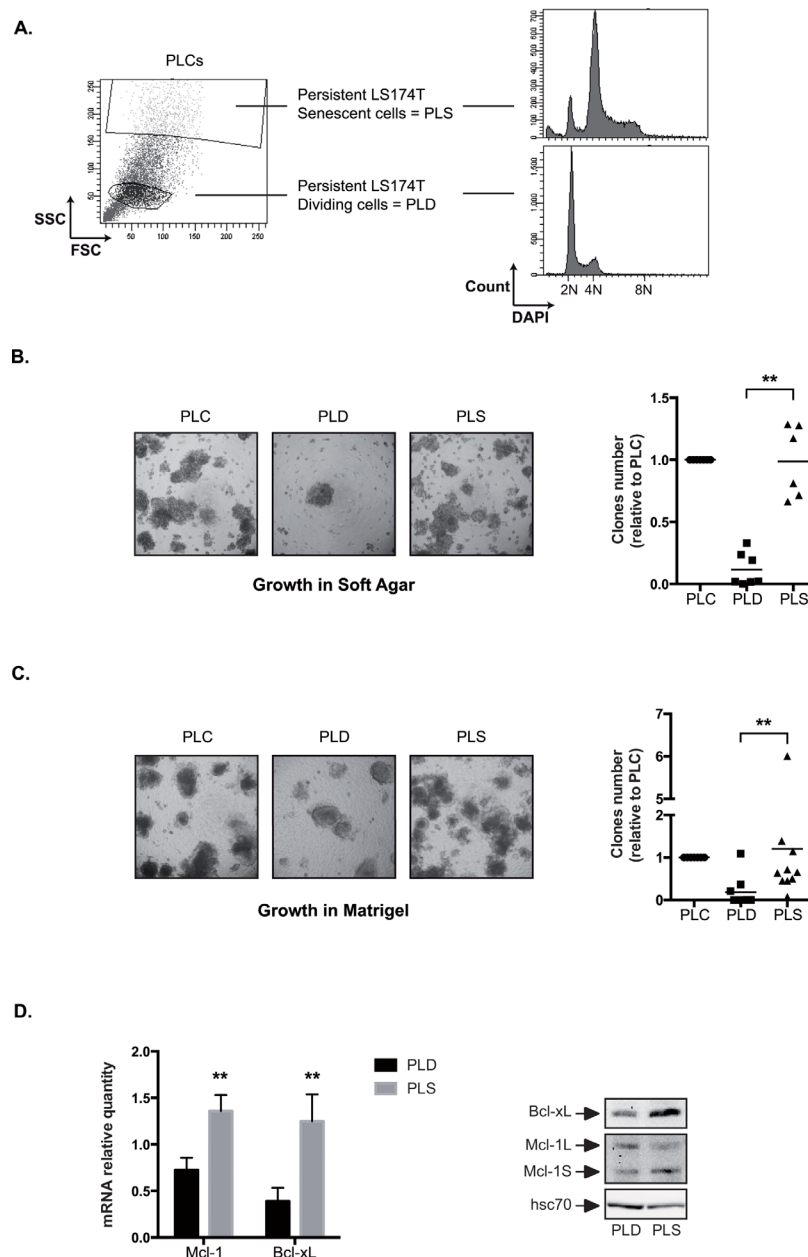


Figure 8: PLS cells grow in low adhesion conditions. A. Following cells sorting and DAPI DNA staining after 3 days of culture, DNA content has been analyzed in PLD (enriched dividing cells = low FSC/SSC) and PLS (enriched senescent cells = high FSC/SSC) by flow cytometry (n=3, one representative image is shown). B and C. Growth of the PLD and PLS was evaluated in soft agar (B) or in matrigel (C). 10 000 cells were used in each experiment. Representative images are shown (x40) and the number of clones growing in low adhesion was quantified after 10-20 days (n=6 for soft agar and n=9 for matrigel). D. The mRNA and protein expressions of Mcl-1 and Bcl-xL have been evaluated by quantitative RT-PCR (n=5 +/- sd) and by western blot analysis (n=4) using total cell extracts of PLD or PLS cells as indicated.

DISCUSSION

Colorectal tumors generally fail to respond to irinotecan within 8-9 months of treatment, indicating that some cancer cells adapt to this genotoxic drug [21]. We have previously described that Myc signaling and DNA repair pathways play an important role in chemotherapy resistance, notably when deregulated by the STAT3 oncogene [24, 36, 38, 39]. We now extend these results, showing that a small fraction of LS174T cells can tolerate this treatment, escape senescence and emerge as a dividing population. This adaptation was reversible since persistent cells regained drug sensitivity. In addition, cells with abnormal polyploid DNA content were present within the PLC population. Most importantly, PLCs were able to grow in low adhesion conditions and to proliferate within a matrigel matrix. Thus, although they regained sn38 sensitivity, these cells evolved to resist anoikis and become more aggressive. Since oncogenic progression is associated with an intrinsic drug resistance program [40, 41], a subpopulation of resistant cells already present before the treatment could be theoretically responsible for senescence resistance and repopulation. However, we believe that a selection was unlikely to occur, since the low proliferation rate during the initial induction of senescence is not expected to favor mutagenesis and since the final population switched back to the same sn38 sensitivity. In addition, growth in low adhesion was observed very early during the treatment, in the absence of cell division (Figure 3E/F). Since parental cells did not grow in soft agar in our experimental conditions (3% FBS), this further indicates that the selection of a preexisting clone was unlikely to occur. In mammary epithelial cells, it has been proposed that cell cycle arrest and p21waf1 overexpression lead to anoikis resistance [42, 43]. This suggests that growth in low adhesion might be a common

feature of the early response to genotoxic treatments, as a consequence of growth arrest and senescence induction. Since, anoikis resistance relies on Erk up-regulation and Bim inactivation, it will be interesting to determine the role of the Erk pathway during the escape to sn38.

We also observed that PLCs emerged as an heterogeneous population, composed of dividing (PLD) and senescent cells (PLS). This leads to the hypothesis that cells entered cell cycle arrest but that a few clones exit this suppressive pathway by a phenotypic switch that reconstitutes a complete dividing and sensitive population. As stated above, this adaptive mechanism has already been described in bacteria where so-called persister bacteria resist antibiotic treatment and reconstitute a full population which is again sensitive to the same antibiotic [19]. The manner in which this phenotypic adaptation occurs remains to be determined but it does not rely on any genetic change. Interestingly, this mechanism has been described recently in lung cancer, showing that equivalent persistent cells exist in human cancer and can tolerate chemotherapy [18]. Other results have reported that breast cancer stem cells and their differentiated counterparts exist in a dynamic equilibrium and that the conversion between the two cell types is regulated by inflammatory cytokines [14]. Further experiments are therefore necessary to clarify the interactions between the PLS and PLD and the relations between the subpopulations. It has been previously reported that senescent cells can stimulate cancer cell growth and invasion through a secretory phenotype and the production of matrix metalloproteinases [35]. In line with these observations, our results indicate that PLS grew in low adhesion conditions whereas this was not the case of the dividing subpopulation. It is tempting to speculate that PLS, through the production of an «invasive» secretome, provide a surviving niche where PLD cells could divide. Future experiments are

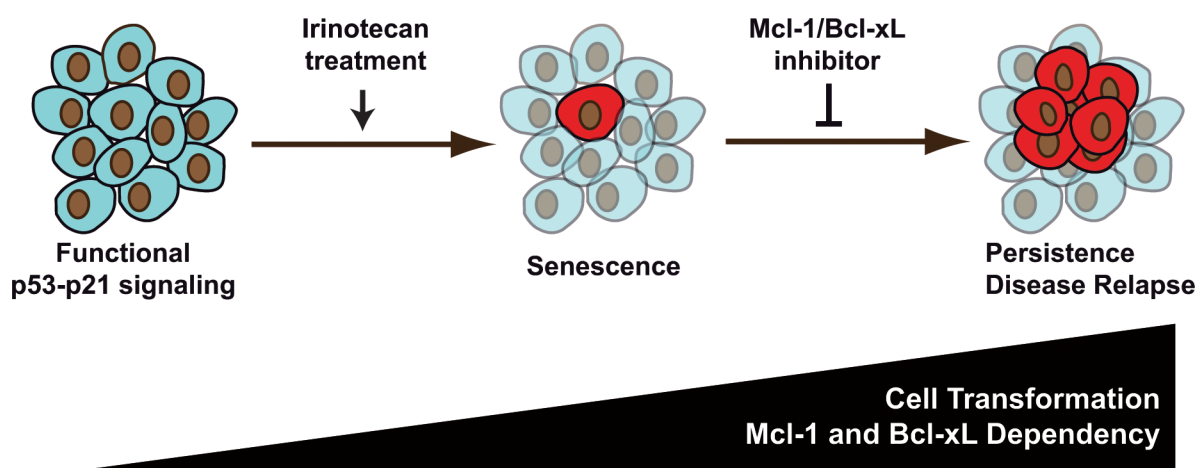


Figure 9: sn38 survival is associated with increased cell transformation and dependency on Mcl-1: an opportunity for new treatments in colorectal cancer. In response to sn38, a small fraction of cells escapes the senescence suppressive arrest and emerges as an heterogeneous and more transformed population. We speculate that these cells are responsible of treatment failure and disease relapse. Since surviving cells depend on Mcl-1 signaling (and to a lesser extent on Bcl-xL), we propose that inhibitors of the Bcl2 family should be used to improve irinotecan efficiency in the treatment of colorectal cancers.

necessary to determine if a cooperation between these two subpopulations is necessary to sustain an invasive phenotype.

These adaptations illustrate the importance of tumor heterogeneity in treatment failure [44]. Although targeted therapies can reduce the activity of a deregulated oncogene, much less is known on how we could prevent the emergence of heterogeneous persistent cells in response to treatment. Future experiments should identify synthetically lethal drugs that could target specific subpopulations and allow a complete eradication of cancer cells when used in combination with irinotecan. The survival of resistant populations has been correlated with rescue pathways, such as the Met and IGFR receptors or secreted proteins of the Wnt and Hedgehog family [15, 45]. Since anti-EGFR targeted therapies such as cetuximab and panitumumab improve tumor response when used in combination with irinotecan in colorectal cancer [46, 47], it will be interesting to determine the effect of the EGF pathway and of these antibodies on PLCs emergence. In light of our results, we also propose the hypothesis that inhibitors of Mcl-1 and Bcl-xL should be tested in combination with irinotecan to prevent cell emergence (Figure 9). Phase I and phase II trials have already enrolled patients suffering from lymphoid malignancies or small-cell lung cancers to test the efficiency of BH3 mimetics such as ABT-263 or ABT-199 [32]. Inhibitors of Mcl-1 have been recently described but direct and non toxic molecules have yet to be tested in clinic [48]. We therefore propose the hypothesis that these inhibitors should be used in combination therapy to prevent emergence and reduce the occurrence of irinotecan-refractory colorectal carcinomas.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and treatment emergence

Colorectal cell lines (American Type Culture Collection) were maintained in antibiotic-free RPMI 1640 medium (Lonza), supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained at 37 °C in 5% carbon dioxide. Cells were routinely tested for the absence of mycoplasma contamination. Unless indicated, note that cell treatments were performed in 3% FBS. For persistent cell generation, cells were treated for the indicated times with sn38 (5ng/ml; Tocris Bioscience 2684) in 3% FBS, washed with PBS and then restimulated with fresh 10% FBS. Proliferation generally resumed after 3-5 days. Other treatments were used : Salinomycin (1 or 5µM; Sigma Aldrich S6201) and ABT737 (1µM; Selleckchem S1002).

Cell transfection, siRNA

RNA interference experiments were performed by transfection of 50 nM of prevalidated siRNA against Mcl-1 (Ambion AM51331 (ID:120642) or Cell signaling 6315), or control siRNA (MWG 5'-GCACUAAACUACCGUGAUUATT-3' and 5'-GAAAGAAGCACUCGUAUAATT-3') using DharmaFect-4 (Dharmacon), according to the manufacturer's instructions.

Clonogenic Assay

Assays were performed in control or treated cells as well as in PLCs to evaluate proliferation and survival. 500 to 1500 cells were seeded into 6-well cell culture plates with 10% FBS and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 7 to 10 days, then washed twice with PBS, and stained with 0.4% crystal violet. The colonies were then washed twice with water, visualized with a Bio-Rad Chemi Doc XRS Imaging device and counted using Quantity One imaging software (Bio-Rad).

Soft Agar / ECM gel Assay

Cell preparation is a very sensitive step. Cells were plated the first day in 3% FBS and treated or not with sn38 after 24hr. Four days later, adherent cells were removed with trypsin for 10 minutes and resuspended in 10% FBS culture medium. If grown and treated in 10% FBS during these 5 days, note that parental LS174T cells grew in soft agar, whereas this was not the case in 3% FBS. After centrifugation, cells pellet was suspended with 10% FBS culture medium and KOVA slides (Hycor) were used for cell count. For each samples, a minimum of three counts were carried out using three different slides chambers. The average of these three counts was used to calculate the volume of cell suspension to obtain a 1.10⁶ cells/mL solution, in 100µL of 10% FBS culture medium. 5µL or 10µL of this, containing 5 000 or 10 000 cells, was transferred to 1,5mL tube. These cells were suspended in 100 µl of preheated agarose and then seeded on the lids of agar-coated 96-well plates. The base agar layer contained 50 µl of 1% agarose (Invitrogen) in 10% FBS culture medium with Penicillin-Streptomycin (Lonza). The 100 µl top agarose solution, containing the cells, was composed of 0,35% low melting point agarose (Promega) in 10% FBS culture medium with antibiotics. From one to three weeks after incubation at 37°C with 5% CO₂, cell clones were counted and images were made. Every sample was tested in three technical replicates. Representative pictures were shown and the average of these three replicates was used for the clones count. For growth in ECM gel, the top agarose solution was substituted by half diluted ECM gel

(Sigma) in 10% FBS culture medium with antibiotic.

Tumor Xenografts

We conducted animal study in accordance with the guidelines approved by the Institutional Ethical Committee for Experimental Animal. Male Balb/c-nu mice were inoculated with one million cells subcutaneously in the right flank at the age of 8 to 9 weeks. Electronic caliper was used to measure the length (L), width (W) and depth (D) of tumor 2 to 3 times per week. Tumor volume was estimated by applying the following equation: $0.52 \times L \times W \times D$. Experiments were conducted using six mice per group.

β -Galactosidase (β -Gal) staining

Cells were fixed for 15 min (room temperature) in 1% formaldehyde, washed with PBS and incubated at 37°C (no CO₂) with fresh staining solution: 0.3 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal, Fermentas), 40 mM citric acid (Sigma), 40 mM sodium phosphate (Sigma) (stock solution (400 mM citric acid, 400 mM sodium phosphate) must be at pH6), 5 mM potassium ferrocyanide (Sigma), 5 mM potassium ferricyanide (Sigma), 150 mM NaCl (Sigma), 150 mM MgCl₂ (Sigma). SA- β -GAL-positive cells were quantified after 16-20 hrs as compared to unstained cells.

Flow Cytometry

DAPI DNA staining: Trypsinized cells were washed with PBS 2% BSA and 250 000 cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at 37°C, then washed and incubated with cold 90% methanol at 4°C for 30 min. After washing, cells were then incubated with DAPI (5 μ g/ml) in PBS 2% BSA 0.2% Triton for one hour at room temperature. Cells were then analyzed by flow cytometry. Where indicated, vindelov staining was also used to analyze DNA content. **Ki67 staining :** Cells were trypsinized, washed with PBS and incubated with cold 70% methanol at 4°C for one hour. Cells were then washed twice with PBS Tween 0,1% and PBS Tween 0,1% BSA 1%. Then, cells were incubated 30 min at room temperature with mouse anti-human Ki-67(Dako M7240) or with mouse IgG1 (Beckman Coulter IM0571) as a control isotype. After washing, cells were incubated 30 min at room temperature with FITC goat anti-mouse IgG as secondary antibody. After washing, DAPI DNA staining was performed as described above. **BrdU staining** (APC BrdU Flow Kit; BD Pharmingen 552598) : BrdU was added to cell culture (10 μ M) 4 hours before the end of the experiment. The following steps were performed according to the manufacturer's

instructions. **pH2AX staining :** First steps were performed as described in «*DAPI DNA staining*» procedure. Before DNA staining, 250000 cells were incubated one hour at room temperature with 31 ng A488 mouse anti-pSer139 H2AX (BD Biosciences 560445) or with 31 ng A488 mouse IgG1k (BD Biosciences 557721) as control isotype control. **Extracellular staining :** Cells were harvested by chelating with PBS 2mM EDTA pH 8 and washed with PBS 2% BSA. 250 000 cells were incubated 15 min at room temperature with 12 ng APC mouse anti-CD44 (BD Biosciences 559942) or with 12 ng APC mouse IgG2bk (BD Biosciences 555745) as control isotype; or with 31 ng A647 rat anti-LGR5 (BD Biosciences 562903) or with 31 ng A647 rat IgG2bk (BD Biosciences 557691) as control isotype; or with 0.25 μ L PE mouse anti-CD133 (Miltenyi Biotec 130-098-826) or with 0,25 μ L PE mouse IgG1 (Miltenyi Biotec 130-098-845) as control isotype. After two washes, cells were analysed by FACS. **ALDH staining:** A kit was used for ALDH activity detection (Aldefluor Stemcell technologies 01700).

FACS cell sorting

Cells were trypsinized, washed with PBS 1% FBS, filtered through a 40 μ m sterile cell strainer and then processed using a FACSaria Cell Sorter (BD Biosciences).

Western Blotting

The following antibodies were used: cleaved Caspase 3 (Asp175) (1/1000; Cell signaling 9661), Bim (1/1000; Millipore AB17003), Bax (1/1000; Cell signaling 2774), monoclonal anti-Bcl-2 (1:1000; Santa Cruz sc 7382), rabbit polyclonal anti-Mcl-1 (1:1000; Santa Cruz sc 819), rabbit monoclonal anti-p21 (1:1000; Cell Signaling 2947), mouse monoclonal anti-HSC70 (1:1000, Santa Cruz sc 7298).

Quantitative PCR

Analyses were performed following DNase I treatment (Fermentas), using the comparative CT method ($2^{-(\Delta Ct)}$), with normalization of the target gene expression to the endogenous housekeeping gene RPLPO or G3PDH. PCR primers sequences were as follows: RPLPO (5'-AACCCAGCTCTGGAGAAACT-3' and 5'-CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'), G3PDH (5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' and 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'), Mcl-1 (5'-CGTAAGGACAAAACGGGACTGGC-3' and 5'-ACCTGCAAAAGCCAGCAGCACA-3'), Bcl-xL (5'-GTAAACTGGGGTCGCATTGT-3' and 5'-TGCTGCATTGTTCCCATAGA-3'), p21 (5'-GCTCCTTCCCATCGCTGTCA-3' and

5'-TCACCCTGCCCAACCTTAGA-3'), AURKA
(5'-GCCCTCTGGGTAAAGGAAAG-3' and
5'-TCCAAGTGGTGCATATTCCA-3') and PLK1
(5'-AAGAGATCCCGGAGGTCCTA-3' and
5'-GCTGCGGTGAATGGATATT-3').

Statistical Analysis

All values were expressed as mean +/- standard deviation (SD). Differences were analysed using non parametric tests (Mann-Whitney and Wilcoxon tests). *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (comité du Maine et Loire), the Canceropole Grand Ouest, the Pays de la Loire region, the Fondation pour la Recherche Médicale and the Agence Nationale de la Recherche.

Abbreviations

PLCs, Persistent LS174T Cells

REFERENCES

- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ and Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24(22):2463-2479.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ and Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003; 113(6):703-716.
- Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* 2003; 63(11):2705-2715.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM and Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell.* 2002; 109(3):335-346.
- Singh A and Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010; 29(34):4741-4751.
- Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging (Albany NY).* 2012; 4(3):159-165.
- Leontieva OV, Demidenko ZN and Blagosklonny MV. Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(24):8832-8837.
- Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV and Blagosklonny MV. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle.* 2009; 8(12):1888-1895.
- Demidenko ZN and Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle.* 2008; 7(21):3355-3361.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S and Watt FM. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009; 23(7):798-803.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J and Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133(4):704-715.
- Eyler CE and Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2008; 26(17):2839-2845.
- Scheel C and Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *Int J Cancer.* 2011; 129(10):2310-2314.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G and Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(4):1397-1402.
- Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL and Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell.* 2011; 145(6):926-940.
- Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C and Puisieux A. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell.* 2008; 14(1):79-89.
- Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P and Puisieux A. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell.* 2004; 6(6):625-630.
- Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M and Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010; 141(1):69-80.
- Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M and Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* 2012; 20(12):577-585.
- de Carne Trecesson S, Guillemain Y, Belanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, Gamelin E, Juin P, Barre B and Coqueret O. Escape from p21-mediated oncogene-induced

- senescence leads to cell dedifferentiation and dependency on anti-apoptotic Bcl-xL and Mcl1 proteins. *J Biol Chem*. 2011.
21. Chibaudel B, Tournigand C, Andre T and de Gramont A. Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2012; 4(2):75-89.
 22. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB and Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(10):714-726.
 23. Chester JD, Joel SP, Cheeseman SL, Hall GD, Braun MS, Perry J, Davis T, Button CJ and Seymour MT. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral cyclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21(6):1125-1132.
 24. Vigneron A, Gamelin E and Coqueret O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Emel endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res*. 2008; 68(3):815-825.
 25. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW and Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998; 282(5393):1497-1501.
 26. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*. 1996; 381(6584):713-716.
 27. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J and Roninson IB. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999; 18(34):4808-4818.
 28. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA and Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009; 138(4):645-659.
 29. Scheel C and Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22(5-6):396-403.
 30. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, Hermans KG, Gibson L, Wang Y, Tsatsanis A, Gallinger S and Dick JE. ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell*. 2012; 21(6):777-792.
 31. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegbarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ and Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007; 449(7165):1003-1007.
 32. Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S and Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(7):455-465.
 33. Sarosiek KA, Ni Chonghaile T and Letai A. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 2013; 23(12):612-619.
 34. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW and Huang DC. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*. 2006; 10(5):389-399.
 35. Rodier F and Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011; 192(4):547-556.
 36. Courapied S, Cherier J, Vigneron A, Troadec MB, Giraud S, Valo I, Prigent C, Gamelin E, Coqueret O and Barre B. Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription factor. *Mol Cancer*. 2010; 9:205.
 37. Krystyniak A, Garcia-Echeverria C, Prigent C and Ferrari S. Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene*. 2006; 25(3):338-348.
 38. Sellier H, Rebillard A, Guette C, Barre B and Coqueret O. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy? *JAKSTAT*. 2013; 2(3):e24716.
 39. Courapied S, Sellier H, De Carne Trecesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, Barre B and Coqueret O. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage Upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem*. 2010; 285(35):26765-26778.
 40. Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002; 108(2):153-164.
 41. Barre B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E and Coqueret O. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med*. 2007; 13(1):4-11.
 42. Collins NL, Reginato MJ, Paulus JK, Sgroi DC, Labaer J and Brugge JS. G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12):5282-5291.
 43. Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK and Brugge JS. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(8):733-740.
 44. Brock A, Chang H and Huang S. Non-genetic heterogeneity-a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(5):336-342.
 45. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007; 316(5827):1039-1043.
 46. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I and Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(4):337-345.
 47. Staal S, O'Connell MJ and Allegra CJ. The marriage of

growth factor inhibitors and chemotherapy: bliss or bust? *J Clin Oncol.* 2009; 27(10):1545-1548.

48. Wei G, Margolin AA, Haery L, Brown E, Cucolo L, Julian B, Shehata S, Kung AL, Beroukhi R and Golub TR. Chemical genomics identifies small-molecule MCL1 repressors and BCL-xL as a predictor of MCL1 dependency. *Cancer Cell.* 2012; 21(4):547-562.

4. DISCUSSION

4.1. Les lignées colorectales répondent différemment au traitement.

Nous avons étudié la réponse à l'irinotécan dans les trois lignées colorectales HT29, HCT116 et LS174T. Suite au traitement, les cellules HT29 se dirigent vers le processus apoptotique, alors que les cellules HCT116 et LS174T entrent en sénescence (Figure 52). Une différence majeure entre ces lignées est l'altération du gène TP53. Présente uniquement chez les cellules HT29, elle prive p53 de son activité transcriptionnelle et inhibe donc l'expression de p21 suite au traitement (Bhonde et al., 2005). Comme ce qui a été dit dans l'introduction de cette thèse, p21 est essentiel à l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence. Chez les cellules HCT116 et LS174T, suite à l'activation du point de contrôle G2/M, l'inactivation prématurée du complexe cycline B/CDK1 serait responsable d'une sortie ou d'un saut de mitose. Les cellules tétraploïdes entreraient en sénescence lors de la phase G1 suivante. Chez les cellules HT29, le maintien d'un certain niveau d'activité du complexe cycline B/CDK1, en raison de l'absence de p21 et d'un point de contrôle G2/M défaillant, induirait la mort mitotique. Elle serait aussi due à l'inactivation de Bcl-xL par phosphorylation et à la dégradation de Mcl-1 (Sakurikar et al., 2012) (Sakurikar, Eichhorn, Alford, & Chambers, 2013). Ces résultats illustrent la diversité de réponse à la chimiothérapie entre lignées.

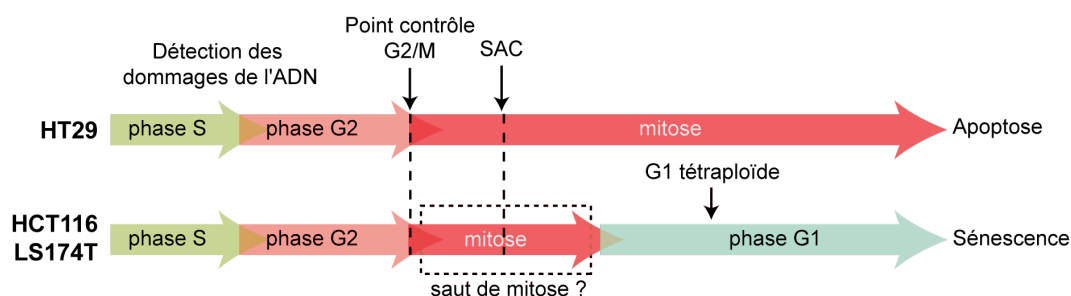


Figure 52 : Diversité de réponse au sn38 entre lignées colorectales. Les cellules HT29 font de l'apoptose alors que les cellules HCT116 et LS174T entrent majoritairement en sénescence.

Les lignées cellulaires sont issues de prélèvements tumoraux qui ne représentent certainement pas la diversité tumorale dans son ensemble. Au sein de la même tumeur, il est possible que certains clones cellulaires déclenchent le processus apoptotique alors que d'autres entrent en sénescence. De plus, au sein du même clone tumoral, génétiquement homogène, plusieurs réponses cellulaires pourraient également intervenir suite à la chimiothérapie comme le suggèrent les résultats de Karen Gascoigne et Stephen Taylor sur des lignées cellulaires (Gascoigne & Taylor, 2008).

Nos premiers résultats présentent la réponse majoritaire au sn38 : l'apoptose pour les cellules HT29 et la sénescence pour les cellules HCT116 et LS174T (Figure 52). Cette réponse globale peut masquer d'autres réponses de sous-populations cellulaires minoritaires.

4.2. L'échappement à la sénescence et l'augmentation de l'agressivité tumorale sont induits en réponse au traitement.

Un modèle d'échappement à la sénescence

Dans notre modèle, les cellules HCT116 et LS174T traitées par le s38 entrent majoritairement en sénescence (Figure 52). Cependant, quelques cellules peuvent repopuler lorsqu'elles sont stimulées par du sérum. Même si cette procédure est très éloignée des conditions physiologiques, elle modélise l'élimination du traitement et le retour aux conditions de croissance normale de la tumeur entre chaque cure. En suivant cette procédure chez les cellules LS174T, nous avons mis en évidence l'émergence d'un faible nombre de cellules proliférantes diploïdes (PLD) au sein d'une majorité de cellules sénescents tétraploïdes (PLS). A ce stade, caractérisé par cette cohabitation, les cellules sont qualifiées de persistantes (PLCs). Comme ce qui a été dit, le nombre de cellules proliférantes et de cellules sénescents n'est pas figé. Le rapport entre ces deux populations cellulaires bascule rapidement en faveur des cellules proliférantes. Les PLD constituent au départ un petit nombre de cellules qui échappent aux mécanismes de suppression tumorale et envahissent rapidement l'espace. A l'inverse, alors que les cellules sénescents sont initialement majoritaires, elles deviennent minoritaires avec le temps en raison de la croissance exponentielle des PLD. Notre modèle pourrait correspondre à celui d'une rechute tumorale après une chimiothérapie.

La complexité de ce modèle relève de la coexistence des sous-populations proliférantes et sénescents. Les résultats obtenus avec la condition PLCs sont difficiles à interpréter car il est souvent difficile de savoir quelle population est impliquée. Les cellules proliférantes étant diploïdes et les cellules sénescents tétraploïdes, une astuce a été de séparer les cellules selon leur taille. De plus, lors du processus de sénescence les cellules deviennent plus granuleuses. Nous avons donc séparé les PLD et PLS selon leur profil cytométrique SCC/FSC (granulométrie/taille) à partir de cellules fraîches sans marquage. L'étude des marqueurs de prolifération et de sénescence a validé l'enrichissement des PLD dans la fraction SSC^{low}/FSC^{low} et celle des PLS dans la fraction SSC^{high}/FSC^{high} . Cependant, cette approche devra être perfectionnée pour améliorer la pureté de chaque sous-population par exemple en jouant sur les paramètres de tri.

Les cellules persistantes sont plus agressives que les cellules parentales.

La capacité de prolifération en faible adhérence est une des caractéristiques des cellules transformées et témoigne d'une certaine agressivité. L'acquisition de la résistance à l'anoikis est en effet un pas vers le processus métastatique. Suite à un traitement de quatre jours, alors que la majorité des cellules sont sénescents, la capacité de pousser en faible adhérence est augmentée chez les cellules LS174T. Comme nous l'avons dit, l'acquisition de cette caractéristique ne serait théoriquement pas due à l'enrichissement d'une sous-population cellulaire. Entre les conditions non traitées et 4 jours de traitement, le seul enrichissement que nous avons est un enrichissement de cellules sénescents. De façon contre-intuitive, nos résultats nous poussent à envisager la possibilité que les cellules qui acquièrent une capacité de résistance à l'anoikis puissent être des cellules ayant des caractéristiques de cellules sénescents. Cependant, dans les cellules persistantes, alors que le pourcentage de cellules sénescents est diminué par rapport aux cellules traitées pendant quatre jours, le nombre de cellules capables de pousser en conditions de faible adhérence semble être augmenté. Entre ces deux conditions, la différence est la génération des PLD. Ces résultats suggèrent à l'inverse que l'augmentation des capacités de transformation entre les deux conditions serait due à l'émergence des PLDs.

De façon à résoudre cette énigme, nous avons réalisé des tests de croissance en faible adhérence à partir de cellules triées. Les résultats après le tri des PLD et des PLS montrent de façon étonnante que c'est la fraction SSC^{high}/FSC^{high} enrichie en PLS qui conserve cette capacité et pas celle enrichie en PLD. L'hypothèse qui semble la plus plausible est que les cellules PLS sécrètent des facteurs paracrines essentiels qui permettent aux cellules PLD, contaminantes dans la fraction SSC^{high}/FSC^{high} , d'acquiescer cette capacité. Après quatre jours de traitement, les cellules à l'origine des PLD pourraient être présentes et l'induction du phénotype de sénescence permettrait l'augmentation de la transformation observée à ce temps. De façon paradoxale, le phénotype de sénescence apparaîtrait alors comme favorisant la résistance à l'anoikis et probablement la promotion tumorale.

Notre modèle d'étude est un modèle d'échappement à la sénescence en réponse à la chimiothérapie. Il se distingue donc par la coexistence de cellules proliférantes et sénescents. En séparant ces cellules selon leur profil SSC/FSC , nous pouvons étudier le rôle de chaque sous-population et leur dépendance mutuelle. De cette façon, nous avons identifié les cellules sénescents comme nécessaires aux capacités transformantes des cellules persistantes PLCs, générées après le traitement.

4.3. Les protéines Mcl-1, Bcl-xL et p21 sont impliquées dans l'échappement à la sénescence et dans la résistance à l'anoikis.

Un rôle passif pour Bcl-xL dans le processus de sénescence?

Nos résultats montrent que la protéine Bcl-xL est sur-exprimée en réponse au traitement lors de l'induction de la sénescence. Alors que Bcl-2 n'est pas exprimée, le traitement par l'ABT-737 combiné au sn38, ne suffit pas à induire la mort cellulaire des cellules LS174T contrairement aux cellules HCT116. L'ABT-737 inhibant Bcl-xL, cela semble signifier que cette protéine n'est pas essentielle au choix entre apoptose et sénescence dans les cellules LS174T. Cependant, dans ces expériences, nous avons traité les cellules avec l'ABT-737 seulement les vingt quatre dernières heures. Les deux traitements par le sn38 et l'ABT-737, utilisés en même temps pendant quatre jours, pourraient démasquer une sensibilité plus importante à la mort cellulaire. Dans les PLCs, c'est dans la population de cellules sénescents PLS que l'expression de Bcl-xL est la plus forte. Au vue de l'importance des PLS dans les capacité de transformation des PLCs, il serait intéressant de connaître leur sensibilité au traitement ABT-737 à ce temps tardif. D'autant plus que, lorsque Mcl-1 est inhibée, le traitement ABT-737 semble participer à l'inhibition de l'émergence des PLD et de la capacité de pousser en faible adhérence. Ces résultats confortent l'idée que les PLS, qui pourraient être les seules dépendantes de Bcl-xL, jouent un rôle essentiel dans le chimiorésistance et dans les capacités d'agressivité des PLD.

Un rôle pour Mcl-1 dans l'échappement à la sénescence?

Nos résultats montrent que Mcl-1 est exprimée dans les cellules LS174T et que son expression ne semble pas varier de façon franche au cours de la réponse au traitement. Cependant, l'inhibition de Mcl-1 par ARN interférence induit la mort cellulaire d'une grande partie des cellules en réponse au sn38. Malgré le fait qu'elle ne soit pas nettement sur-exprimée dans les cellules traitées, Mcl-1 a donc un rôle essentiel dans l'inhibition de la mort cellulaire. Comme ce qui a été dit, le niveau expression des protéines de survie peut être considéré comme déterminant pour le choix entre apoptose et sénescence en réponse au traitement. Comme Bcl-xL, Mcl-1 pourrait favoriser le processus de sénescence de manière passive en bloquant l'apoptose lors de la catastrophe mitotique ou lors de la phase G1 suivante. L'expression de Bcl-xL et Mcl-1 serait alors associée à l'induction de la sénescence. Cependant, Mcl-1, et Bcl-xL dans une moindre mesure, ont aussi été décrits comme bloquant ce mécanisme suppresseur. L'équipe de Brian Gastman a en effet montré que la sur-expression de Mcl-1, inhibe la sénescence en réponse à la doxorubicine dans des cellules HCT116, dont la voie p53/p21 est fonctionnelle (Bolesta et

al., 2012). Le niveau d'expression de Mcl-1, décrit comme conditionnant la sensibilité à l'apoptose, module donc également la sénescence (Figure 53).

Dans notre modèle, l'expression de Mcl-1 semble régulée de manière différente dans les PLCs. Les cellules proliférantes PLD expriment un niveau plus important de Mcl-1 que les cellules sénescents PLS. Dans les cellules PLD, la plus forte expression de Mcl-1 pourrait donc être reliée à leur capacité à échapper à la sénescence. Nos résultats montrent d'ailleurs que l'inhibition de Mcl-1, lors du traitement par le sn38, bloque le processus d'émergence des PLD. La perte de Mcl-1 pourrait à la fois sensibiliser les cellules à l'apoptose lors du traitement à un temps précoce mais elle pourrait donc aussi inhiber l'émergence des PLD. Alors que le rôle anti-apoptotique de Mcl-1 est très décrit, son rôle précis dans l'échappement à la sénescence reste à déterminer. L'équipe de Brian Gastman montre cependant que l'action «anti-sénescence» de Mcl-1 est indépendante de son action anti-apoptotique. En réponse au traitement, la sur-expression de formes mutantes de Mcl-1 ayant un domaine BH3 non fonctionnel n'altère en effet pas le blocage de la sénescence par Mcl-1. Les résultats présentés suggèrent que Mcl-1 pourrait inhiber l'action de p21 lors du processus de sénescence (Bolesta et al., 2012). Nos résultats n'apportent pas d'explication sur ce mécanisme mais ils appuient l'idée que Mcl-1 a un rôle essentiel dans l'échappement à cette suppression.

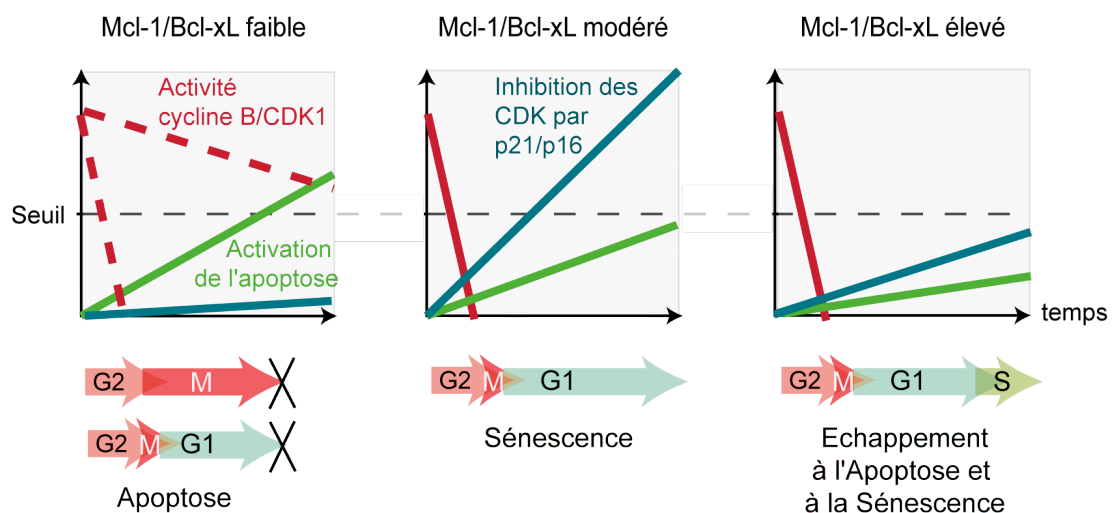


Figure 53 : Modèle présentant la réponse à la chimiothérapie en fonction du niveau d'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-xL. Lorsque le niveau d'expression de ces protéines de survie est faible, les cellules peuvent mourir en mitose ou à la sortie de mitose par apoptose. Un niveau modéré serait associé à l'induction de la sénescence alors qu'un niveau élevé pourrait permettre l'échappement à la mort cellulaire et la reprise de la prolifération.

La résistance à l'anoikis observée après le traitement par le sn38 semble aussi dépendre de l'expression de Mcl-1. L'anoikis est un processus de mort cellulaire dépendant de l'activation des caspases et donc de la perméabilisation mitochondriale par les protéines pro-apoptotiques. Le rôle des protéines Mcl-1 et Bcl-xL dans cette résistance peut donc être directement associé à leurs fonctions anti-apoptotiques. Combiné au rôle «anti-sénescence» de Mcl-1, les protéines de survie Mcl-1 et Bcl-xL pourraient jouer un rôle essentiel dans la rechute tumorale et l'acquisition de caractéristiques métastatiques suite à une chimiothérapie.

Un rôle pour p21 dans l'induction de la sénescence mais pas dans son maintien.

Le rôle précoce des protéines Bcl-xL et Mcl-1 est relativement passif en faveur de la sénescence. En revanche, p21 a un rôle actif dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à la chimiothérapie. Nos résultats montrent que les processus d'échappement et de résistance à l'anoikis dépendent de son induction précoce lors du traitement. p21 étant déterminant dans l'induction de la sénescence en réponse au traitement, cela signifie que la phénotype de sénescence et d'émergence des PLD sont intimement liés. De plus, les résultats montrant que l'inactivation de p21 induit une forte diminution de la croissance en faible adhérence suggèrent que cette capacité est reliée au phénotype de sénescence. Le fait que les cellules enrichies en PLS sont nécessaires à cette capacité conforte cette notion. Les travaux de Joan Brugge ont montré que la sur-expression de p21 pouvait conférer une résistance à l'anoikis (Collins et al., 2005). Dans ces conditions, le blocage du cycle en phase G1/S est associé à l'activation de ERK et à l'inhibition de l'expression de Bim, nécessaire à l'anoikis. De plus comme ce qui a déjà été dit, en tant qu'inhibiteur des complexes cycline/CDK, p21 inhibe indirectement l'expression des gènes cibles d'E2F1 tels que PUMA, Noxa et Bim. L'expression de p21 lors de l'induction de la sénescence permettrait donc le blocage du processus apoptotique dont dépend l'anoikis.

La croissance en faible adhérence ne résulte pas uniquement de la résistance au processus apoptotique, en plus d'inhiber la mort cellulaire, il faut que les cellules soient capables de proliférer. Cette capacité proliférative peut difficilement être attribuée aux cellules sénescents mais serait le fait des cellules PLD. Théoriquement les PLD devraient sous-exprimer p21 par rapport au PLS. De façon surprenante, entre les PLD et les PLS le niveau d'expression de p21 est identique. Nos résultats montrent que p21 est fortement induit à des temps précoces après l'administration du traitement mais son expression est diminuée dans les PLCs et également dans les PLS. A ce temps, le maintien de la sénescence dans les PLS pourrait dépendre d'autres voies comme celle de p16.

Le maintien de la sénescence pourrait dépendre de p16 dans les PLS.

p16 est une protéine associée au phénotype de sénescence. Contrairement à p21, elle n'interviendrait pas dans l'induction de la sénescence mais plutôt dans son maintien. Dans les cellules LS174T et en réponse au sn38, son expression pourrait intervenir tardivement après la génération des dommages (Poele et al., 2002). L'expression de p16 pourrait théoriquement dépendre de l'inhibition de l'expression d'EZH2. EZH2 fait partie du complexe de répression transcriptionnelle des Polycomb. En méthylant le locus INK4a/ARF, il est responsable de l'inhibition de l'expression de p16. EZH2 étant une cible transcriptionnelle des protéines E2F, p21 participe à l'inhibition de son expression comme ce qui a été dit dans l'introduction (Figure 20). Au laboratoire, un autre étudiant en thèse, Julien Gouju, a montré que l'expression transcriptionnelle de EZH2 était diminuée en réponse au sn38 et dans les PLCs (Figure 54A). En revanche, dans les PLD, son expression est plus importante que dans les PLS et retrouve un niveau proche de celui des cellules LS174T parentales (Figure 54B). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de p16 dans ces deux populations. Une différence entre les PLD et les PLS pourrait donc être leur capacité à induire p16. L'induction de p16 pourrait permettre aux cellules PLS de maintenir leur phénotype de sénescence grâce à un faible niveau d'expression d'EZH2. En revanche, les cellules à l'origine des PLD pourraient sur-exprimer EZH2 et être incapables d'exprimer p16. Cette différence de régulation de p16 pourrait expliquer l'échappement à la sénescence observé. Ces hypothèses constituent une piste intéressante à tester.

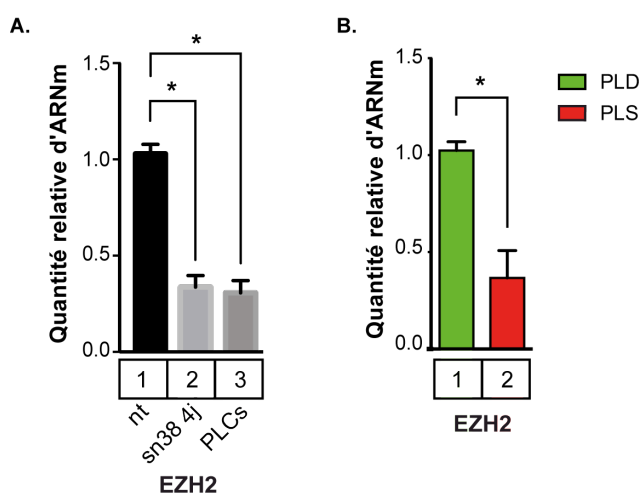


Figure 54 : Expression d'EZH2 en réponse au traitement sn38 et dans les PLCs. A. et B. L'expression transcriptionnelle d'EZH2 a été évaluée par RT-PCR quantitative dans des cellules LS174T non traitées, traitées quatre jours et dans les PLCs (n=3 +/-sd) (A.). Elle a aussi été évaluée dans les cellules PLD et PLS enrichies après tri (n=4 +/-sd) (B.). Ces résultats ont été obtenus par Julien Gouju.

Entre apoptose, sénescence et échappement aux mécanismes de suppression, le choix dépend en partie de l'expression et de l'activation des protéines Bcl-xL, Mcl-1, p21 et p16. Dans notre modèle, en réponse au traitement, l'expression relative de Bcl-xL, Mcl-1 et p21 sensibiliserait la majorité des cellules à la sénescence. L'inactivation de ces protéines limite de façon paradoxale l'échappement à la sénescence et la croissance en faible adhérence. De futurs travaux doivent mieux caractériser la régulation de ces protéines dans les deux-sous populations PLD et PLS de façon à mieux comprendre leur implication dans la chimiorésistance.

4.4. Des cellules souches cancéreuses à l'origine des PLD?

De nombreuses questions se posent sur les cellules à l'origine des PLD. Une des hypothèses est que ces cellules pourraient être préexistantes et partager des caractéristiques des cellules souches cancéreuses (CSC).

De façon étonnante la salinomycine accentue la chimiorésistance.

Dans un premier temps, nous avons voulu tester une molécule décrite comme inhibant les CSC mammaires, la salinomycine, en combinaison avec le sn38 (Naujokat & Steinhart, 2012). Théoriquement cette combinaison cible à la fois les cellules souches cancéreuses qui peuvent être quiescentes et les cellules proliférantes. De façon surprenante, l'émergence des PLD est augmentée par rapport au traitement sn38 seul. La sensibilité à la salinomycine des CSC colorectales peut être différente des CSC mammaires. Il est aussi possible que ces molécules chimiques soient instables lorsqu'elles sont administrées ensemble ou que leurs modes d'action interfèrent. Une étude a montré que la salinomycine induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (K. H. Koo et al., 2013). Alors que les dommages induits par le sn38 interviennent majoritairement en phase S, l'arrêt en phase G1 induit par la salinomycine pourrait protéger les cellules des dommages de l'ADN et limiter l'induction de la sénescence. Cela pourrait expliquer l'augmentation de la chimiorésistance associée à la combinaison des traitements salinomycine et sn38.

L'expression de LGR5 peut être modulée en réponse au traitement dans les CSC.

Au cours du traitement sn38 et dans les PLCs, nos résultats montrent une diminution du pourcentage de cellules exprimant les marqueurs CD44^{high}, LGR5 et ALDH ce qui suggère dans un premier temps que ces cellules initiatrices ne sont pas impliquées dans le processus d'émergence. Cependant, dans le tissu colorectal normal, les cellules souches sont des cellules proliférantes LGR5 positives, dont l'expression est régulée par la voie de la β -caténine. Suite au traitement par le sn38, l'arrêt du cycle cellulaire pourrait

être associé à la répression des gènes cibles de la voie de la β -caténine, dont LGR5. Cela signifie que malgré la diminution du pourcentage de cellules LGR5 positives, des CSC pourraient être présentes dans les PLCs et jouer un rôle dans l'émergence. Un article intéressant va dans ce sens (Kobayashi et al., 2012). Suite au traitement par l'irinotécan, les cellules souches cancéreuses LGR5+, présentes au sein des tumeurs, perdent l'expression de LGR5 tout en conservant leurs caractéristiques de cellules souches. Lorsque le traitement est éliminé, elles sont capables de ré-exprimer LGR5. Dans notre modèle, les cellules LGR5 positives représentent environ 5% de la totalité des cellules LS174T parentales. Dans les PLCs, les cellules proliférantes, PLD, ne représentent que 30% en moyenne. Si les PLD reproduisent la hiérarchie des cellules parentales, dans les PLCs le pourcentage de cellules LGR5 positives serait de 5% des 30% ce qui représente seulement 1,5%. Il serait donc intéressant de regarder l'expression de LGR5 dans chaque sous-population.

Bmi-1, une piste intéressante.

D'autres cellules souches pourraient également être impliquées, les cellules +4. Dans la muqueuse intestinale normale, ces cellules constituent une réserve de cellules souches quiescentes capable de restaurer la totalité de la crypte (Vermeulen & Snippert, 2014). Contrairement aux cellules souches proliférantes exprimant LGR5, les cellules +4 pourraient échapper aux dommages de l'ADN générés par le traitement en raison de leur faible prolifération. Bmi-1 est un des marqueurs de ces cellules souches intestinales. Bmi-1 est d'ailleurs sur-exprimé dans les cancers colorectaux (J. H. Kim et al., 2004) (D.-W. Li et al., 2010). Cette protéine fait partie du complexe de répression transcriptionnelle PRC1 et participe à l'inhibition du locus INK4a/ARF qui, comme nous l'avons dit, est crucial pour le maintien de la sénescence. L'expression de Bmi-1 pourrait donc potentiellement jouer un rôle dans la résistance au traitement observée dans notre modèle. L'étude de son implication serait intéressante et importante à réaliser.

Un rôle pour Mcl-1, Bcl-xL et p21 dans les capacités d'initiation tumorale des CSC?

Les résultats que nous avons obtenus suite à l'inhibition de Mcl-1, Bcl-xL et p21 peuvent être réinterprétés sous un angle incluant la présence de cellules souches cancéreuses préexistantes à l'origine des PLD. Ces protéines participeraient au fonctionnement des cellules souches normales et des CSC. Mcl-1 est par exemple décrit comme nécessaire à l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (C. J. V. Campbell et al., 2010a). Sa sur-expression induirait la transformation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques (K. J. Campbell et al., 2010b). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, l'inhibition de Bcl-xL par l'ABT737 améliore la suppression tumorale

par rapport au traitement par la gemcitabine en inhibant spécifiquement les cellules souches cancéreuses quiescentes ou à faible prolifération (Zeuner et al., 2014). Nos résultats montrent d'ailleurs que les cellules LS174T parentales sont très sensibles à l'inhibition de Mcl-1 et Bcl-xL sans traitement (pistes 7 et 8, Figures 40C et 40D). p21 est aussi décrit comme nécessaire à la capacité d'initiation tumorale des cellules cancéreuses du colon (O'Brien et al., 2012). En inhibant la prolifération des cellules souches, il les protégerait des dommages de l'ADN. La dépendance des mécanismes d'échappement à la sénescence et de résistance à l'anoikis à Mcl-1, Bcl-xL et p21 pourrait aussi théoriquement être expliquée par un rôle de protection des cellules initiatrices de cancer.

Un rôle pour les CSC malgré la diminution des marqueurs de CSC en réponse au sn38?

Le critère d'enrichissement n'est pas toujours adapté pour justifier l'implication des cellules souches cancéreuses dans la résistance au traitement et ceci pour plusieurs raisons. En premier lieu, lors de sénescence qui est un mécanisme de suppression tumorale retrouvée in vivo en réponse à la chimiothérapie, les cellules résistantes ne sont de fait pas enrichies à court terme. D'autre part, une caractéristique des cellules souches cancéreuses est leur capacité à générer des cellules plus différenciées. Les CSC qui auraient résisté au traitement pourraient générer des cellules différenciées et reproduire la hiérarchie de la tumeur avant le traitement. L'étude des CSC peut dans ce sens être qualifiée de presque «insaisissable» (Figure 55). De plus, l'expression de certains marqueurs de cellules souches peut être modulée sans que les caractéristiques de ces cellules ne soient altérées. Enfin, la plasticité cellulaire, incarnée par le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse, permettrait à des cellules de passer d'un état différencié à celui de CSC. D'autres travaux mettent en avant les facteurs de l'EMT dans l'échappement à la sénescence. Une étude intéressante montre par exemple que Twist, un facteur de transcription impliqué dans l'EMT, est capable d'activer EZH2 et de bloquer l'expression de p16 (Cakouros et al., 2012). La notion de plasticité amène l'idée que les caractéristiques d'initiation tumorale ne sont pas nécessairement stables et qu'elles peuvent dépendre du micro-environnement.

Les cellules à l'origine des PLD pourraient être des CSC. Qu'elles soient présentes avant le traitement ou générées au cours de la réponse au traitement, elles pourraient initier la re prolifération, caractéristique de l'échappement à la sénescence, et résister à l'anoikis.

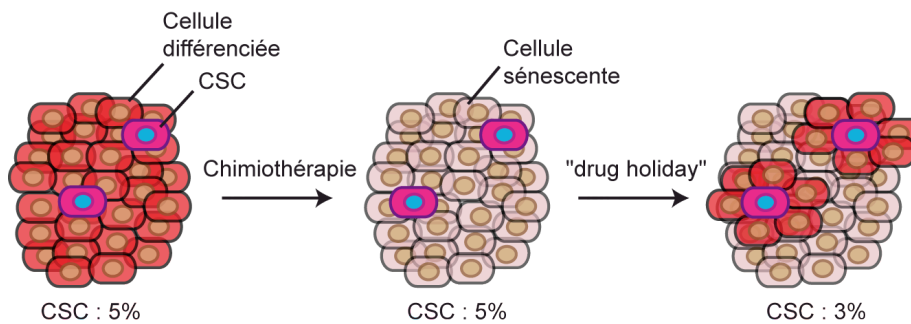


Figure 55 : Implication des CSC dans la chimiorésistance. L'induction du phénotype de sénescence en réponse à la chimiothérapie suppose un maintien de la masse tumorale en l'absence d'élimination de cellules. Les cellules résistantes ne sont donc pas enrichies. Entre les cures, les CSC peuvent recréer la hiérarchie initiale en se différenciant.

4.5. Les cellules sénescentes créent un environnement favorable à la transformation, coopération entre cellules sénescentes et cellules proliférantes

Les caractéristiques d'initiation tumorale et d'agressivité dépendent beaucoup du micro-environnement. Nos résultats suggèrent que les cellules sénescentes sont indispensables à la résistance à l'anoikis des cellules persistantes PLCs. Elles pourraient apporter un type de micro-environnement qui favoriserait cette résistance. Alors que le SASP est parfois décrit comme propageant la sénescence, il pourrait être le vecteur de la promotion tumorale que nous avons observée. Au laboratoire, une autre étudiante en thèse, Marie Moreau, s'intéresse au rôle des protéines sécrétées par les cellules PLCs. Ses résultats montrent clairement que le milieu conditionné (MC) des PLCs augmente les capacités de croissance en faible adhérence et de migration des cellules LS174T parentales (Figure 56). Cela signifie que les protéines sécrétées dans l'environnement lors de l'émergence des PLD sont impliquées dans la résistance à l'anoikis et la migration qui caractérisent les cellules métastatiques. Ces protéines pourraient être sécrétées par les cellules sénescentes. De nombreuses études montrent en effet que les cellules sénescentes augmentent les capacités tumorigéniques des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont injectées chez l'animal (D. Liu et al., 2007) (Bartholomew et al., 2009) (Krtolica et al., 2001) (Coppé et al., 2010b). Les cellules sénescentes pourraient donc promouvoir la progression tumorale et la tumorigénèse chez des cellules non sénescentes (Campisi, 2011).

L'hétérogénéité cellulaire pourrait être la source d'une hétérogénéité de réponse au traitement par l'irinotécan. Des cellules, probablement non touchées par les dommages de l'ADN, parviennent à échapper à la mort cellulaire. D'autres cellules entrent en

sénescence mais influencent à long terme les cellules qui ont conservées leurs capacités prolifératives. La chimiorésistance observée dépendrait donc de la coopération des deux sous-populations PLD et PLS. De futurs travaux doivent mieux caractériser cette relation entre cellules PLD et PLS et identifier des facteurs paracrines responsables de cette chimiorésistance. Ces facteurs pourraient être en cause dans la régulation de l'expression des protéines Mcl-1 et Bcl-xL que nous avons identifiées comme impliquées dans ces processus.

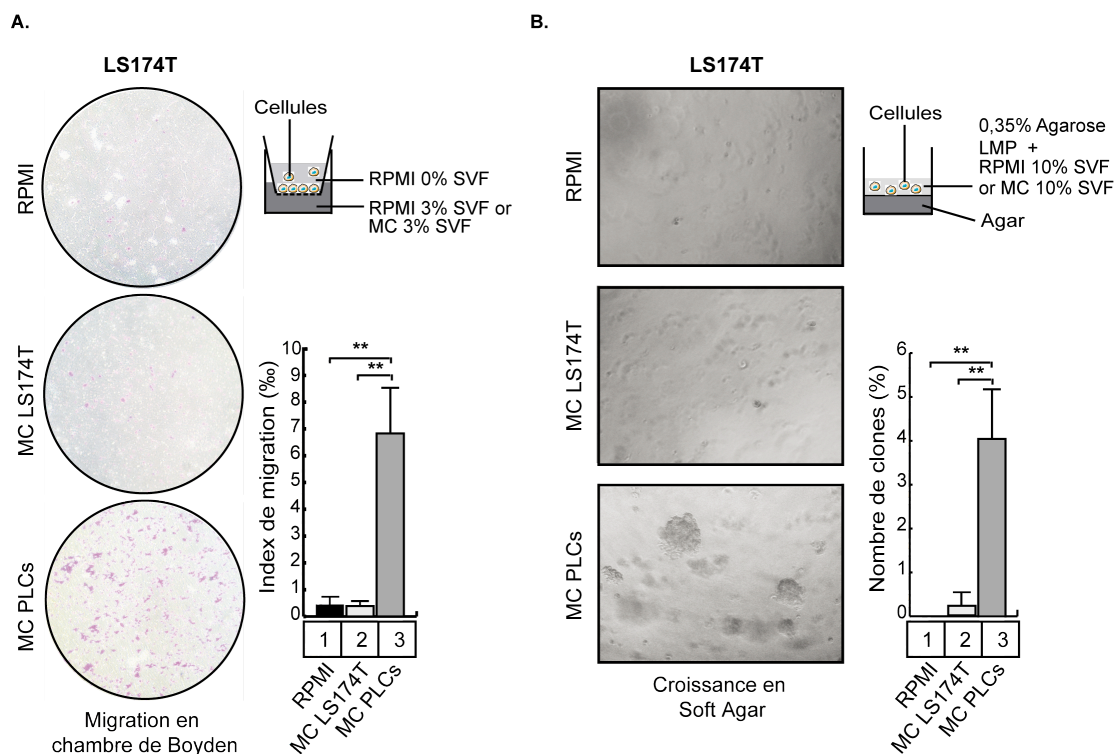


Figure 56 : Les cellules persistantes PLCs sécrètent des facteurs paracrines d'agressivité. A. et B.

Après 24h de carence en sérum, les milieux conditionnés (MC) des cellules LS174T et des PLCs ont été collectés et utilisés pour des expériences de migration en chambre de Boyden et de croissance en faible adhérence. **A.** Comme indiqué sur le schéma, le MC est placé en dessous de la chambre de Boyden. 40000 cellules LS174T ont été déposées à l'intérieur de la chambre. Après 72 heures d'incubation, les cellules présentes sur la membrane sont fixées et colorées au cristal violet. Les cellules présentes sur la face supérieure de la membrane, n'ayant pas migrées, sont ensuite éliminées. Des photos représentatives de quatre expériences sont présentées à gauche et l'index de migration (%) est présenté à droite (n=4 +/-sd). **B.** 5000 cellules LS174T ont été plantées en soft agar pour chaque condition. Des photos représentatives de quatre expériences sont présentées à gauche (x40) et le pourcentage de cellules est présenté à droite (n=4 +/-sd). Ces résultats ont été obtenus par Marie Moreau.

Alors que les cellules PLD incarnent la chimiorésistance, le rôle des cellules sénescents pourrait être sous-estimé. Nos résultats ainsi que les données de la littérature montrent que ces cellules sécrètent des facteurs solubles qui accentuent l'agressivité et la tumorigénicité des PLD. Les cellules sénescents ont donc un rôle actif dans la chimiorésistance.

4.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques : limiter l'hétérogénéité de réponse au traitement et limiter l'induction de la sénescence

L'hétérogénéité tumorale se caractérise par l'existence de cellules à des états de différenciation distincts au sein de la tumeur. Que l'état des CSC soit stable ou modulable, leur sensibilité à la mort cellulaire en réponse à la chimiothérapie est décrite comme différente de celle des cellules plus différenciées. De plus, les tumeurs sont constituées de plusieurs clones ayant des altérations génétiques différentes (Gerlinger et al., 2012) (Burrell & Swanton, 2014). En fonction de ces altérations, ces clones ont des sensibilités différentes aux mécanismes d'apoptose et de sénescence. Comme nous l'avons dit l'accumulation de ces différents niveaux d'hétérogénéités est responsable de la résistance à la chimiothérapie caractéristique des stades tardifs. Les protéines de survie de la famille Bcl-2 ont un rôle anti-apoptotique mais aussi «anti-sénescence». Leur inhibition en combinaison à l'irinotécan, est une stratégie qui pourrait à la fois sensibiliser les cellules à l'apoptose et sensibiliser des cellules non touchées par l'irinotécan seul, à la sénescence. Chaque tumeur pouvant avoir une dépendance spécifique à certaines de ces protéines, des stratégies combinant des BH3 mimétiques ciblant à la fois Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, pourraient être judicieuses. Ces stratégies limiteraient l'échappement à la mort cellulaire et l'hétérogénéité de réponse au traitement (Figure 57).

Les processus de mort ne se valent pas. Contrairement aux cellules apoptotiques, les cellules sénescents influencent à long terme leur environnement en sécrétant des facteurs pouvant favoriser l'agressivité des cellules voisines. Les protéines inflammatoires sécrétées par les cellules sénescents pourraient aussi se propager à l'ensemble des organes et favoriser la progression de la maladie et le processus métastatique. L'utilisation d'anti-inflammatoires dans le traitement des cancers pourrait donc avoir un intérêt (Prihluda et al., 2013) (Figure 57). La genèse même du cancer pourrait dépendre d'un environnement inflammatoire. Une des preuves est que les maladies inflammatoires intestinales prédisposent au cancer colorectal. Cette inflammation pourrait s'accroître avec l'âge, via l'augmentation du nombre de cellules sénescents dans l'organisme, associée au vieillissement et à l'apparition de nombreuses maladies dont les cancers (Naylor, Baker, & van Deursen, 2012). Ces notions identifient la sénescence cellulaire comme délétère. Les thérapies doivent viser l'induction du mécanisme le plus radical, l'apoptose. Les cellules sénescents pourraient même devenir de nouvelles cibles pour les thérapies anti-cancéreuses.

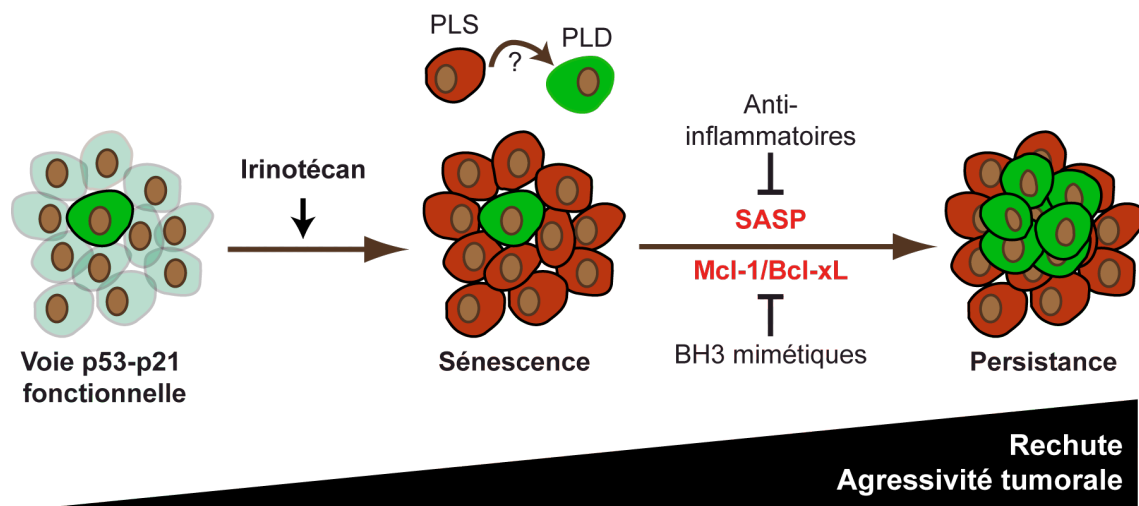


Figure 57 : Stratégies thérapeutiques limitant l'hétérogénéité de réponse à l'irinotécan. Lors du traitement sn38, la majorité des cellules, dont la voie p53-p21 est fonctionnelle, entrent en sénescence. Via le SASP, les cellules sénescents pourraient créer un environnement favorable à la repopulation et à la transformation de cellules non touchées par le traitement. Cette hétérogénéité de réponse au traitement, probablement due en partie à une hétérogénéité cellulaire, pourrait être limitée par l'utilisation d'inhibiteurs de Mcl-1 et Bcl-xL, les BH3 mimétiques, ou par l'utilisation de molécules anti-inflammatoires limitant l'expression du SASP.

5. SUPPLEMENT

Au laboratoire, le rôle de STAT3 dans la réponse au traitement à été très étudié. Au début de ma thèse je me suis intéressé à ce facteur de transcription. Dans ce cadre j'ai participé à l'écriture d'un commentaire qui a été publié en mars 2013 dans le journal JAK-STAT.

STAT3 as a new autophagy regulator

Barbara Jonchère, Audrey Bélanger, Catherine Guette, Benjamin Barré, and Olivier Coqueret*

Paul Papin ICO Cancer Center; Inserm U892; CNRS 6299 and Angers University; Angers, France

Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) proteins are cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus to induce transcription following growth factor or cytokine stimulation. Besides their normal functions, these proteins play an important role in cancer cells through the abnormal activation of cell cycle progression and the deregulation of survival and senescence pathways. New data obtained from the laboratory of Guido Kroemer identifies STAT3 as a new autophagy regulator. In the cytoplasm, in the absence of conventional phosphorylation on the tyrosine 705 residue, STAT3 interacts with the PKR kinase to inhibit eIF2A phosphorylation and so reduce autophagic pathways. This new and nonconventional function of STAT3 has an important role in normal cells but we suggest that it might also affect cancer cells and the response to chemotherapy treatment.

Whereas ubiquitination is well known to induce the degradation of soluble proteins, macroautophagy (also called autophagy) has recently emerged as an evolutionarily conserved process that degrades misfolded protein aggregates, damaged organelles, and abnormal mitochondria. This process relies on the activation of ATG genes and the upregulation of intracellular proteins that specifically recognize aggregates, target them to specific vesicles known as autophagosomes and allow lysosomal fusion.¹ Protein degradation can be followed by catabolic recycling and therefore autophagy can be seen as a powerful mechanism that allows cell survival in a stressful environment such as the one cancer cells encounter.

The role of autophagy in cancer is complex. It has been demonstrated that the inactivation of Beclin-1 (the human ortholog of Atg6, which induces the formation of autophagosomes) is correlated with tumor development using mouse genetic models or human tumor samples. These observations described Beclin-1 as a haploinsufficient tumor suppressor gene, suggesting that autophagy functions as a suppressive pathway.^{2,3} These results were further confirmed by Atg5 and Atg7 deletions in mice, which also led to increased tumor initiation.⁴ This is probably related to the accumulation of the p62/SQSTM1 sequestosome protein, which is normally degraded during autophagy. The failure of autophagy-deficient cells to eliminate p62 leads to DNA damage and the abnormal activation of the Nrf2 and NFκB proteins.⁵⁻⁷ The upregulation of the NFκB transcription factor probably explains why autophagy default also leads to inflammation, as a consequence of the abnormal production of cytokines and chemokines mediated by NFκB. Interestingly, p62/SQSTM1 plays an important role in ras-mediated transformation and this is also correlated with the production of cytokines that are induced during oncogenic stress and senescence escape.^{8,9} This implies that some ras-expressing tumors might depend on p62/SQSTM1, whose expression can be viewed as a consequence of the autophagy downregulation and reduced tumor suppression that occur during the initial stage of cell transformation.

Important results have also demonstrated that autophagy is necessary for oncogene-induced senescence (OIS). OIS is a tumor-suppressor mechanism that induces permanent cell cycle arrest in response to oncogenic signals.^{10,11} It relies

Keywords: STAT3, autophagy, cell death, oncogene, senescence

Submitted: 02/08/13

Revised: 03/18/13

Accepted: 03/18/13

Citation: Jonchère B, Bélanger A, Guette C, Barré B, Coqueret O. STAT3 as a new autophagy regulator. JAK-STAT 2013; 2:e24353; <http://dx.doi.org/10.4161/jaks.24353>

*Correspondence to: Olivier Coqueret;
Email: olivier.coqueret@univ-angers.fr

Commentary to: Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. Mol Cell 2012; 48:667-80; PMID:23084476; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.013>

on the combined activation of the p53-p21waf1 and p16-Rb pathways to induce cell cycle arrest and the transcriptional repression of proliferative genes through heterochromatin formation. Young et al. have demonstrated that OIS induction is preceded by autophagy and the activation of ATG genes.^{12,13} In response to the ras oncogene, the inactivation of these genes by RNA interference reduced senescence as a consequence of autophagy inhibition. During the successive steps that lead to protective growth arrest in response to the ras oncogene, the Akt-mTOR pathway is inactivated and this inhibits phosphorylation of the Foxo3a transcription factor and the ATG proteins, ULK1, Atg13, and Beclin-1.^{14,15} The lack of Akt/mTOR-mediated phosphorylation of Foxo3 allows its nuclear translocation and the transcriptional activation of the ATG genes such as ULK1. In parallel, the lack of Akt/mTOR-mediated phosphorylation of ULK1, Atg13, and Beclin-1 promotes Ambra/Beclin/PI3KC3 association, which is essential for autophagosome formation. These results have been confirmed by a different study showing that ras leads to the upregulation of Beclin-1 and the consequent formation of autophagosomes.¹⁶ In these different experimental conditions, growth arrest was also inhibited following Beclin-1, Atg5, and Atg7 inactivation. Altogether, these observations illustrate the role of autophagy in the context of tumor suppression if we agree that senescence is always a suppressive pathway.¹⁷

As stated above, the role of autophagy in cancer is complex and important studies have demonstrated that its upregulation is necessary for tumor cell survival. Autophagy is expected to play an important role in the condition of hypoxic growth or nutrient privation. In this context, catabolic recycling may be a powerful mechanism that allows cell growth in a difficult cancer microenvironment. In line with this hypothesis, when performed in growing cell lines expressing the ras oncogene, the inactivation of ATG genes is associated with a significant decrease in cell survival.¹⁸ These observations do not necessarily contradict the role of autophagy as a tumor suppressor in the initial stages of cell transformation. Suppressive

functions are generally characterized during acute ras signaling, in the early stage of oncogenic signaling. This is a different situation compared with established cell lines, which are growing with established ras mutations. These cells have by definition inactivated the suppressive mechanisms induced by the oncogene^{19,20} and are addicted to various survival, metabolic, and dedifferentiation pathways as we recently demonstrated in colorectal cancer cells.²¹ In these two different contexts, we can speculate that autophagy has different functions, suppressive in the early stages of cancer initiation and oncogenic in cells that have bypassed senescence and cell death protections.

In addition to many studies on ras signaling, the role of autophagy has also been characterized in other intracellular signaling pathways. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) proteins are latent cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus to induce gene transcription.²² Binding growth factors to their receptors activates intracellular kinases such as Janus or Src, which then phosphorylate STAT3 on its 705 tyrosine residue (Y705). Although it was initially believed that dimerization and Y705 phosphorylation lead to the only active form of STAT3, it is now recognized that STAT3 can exert numerous nuclear or cytoplasmic functions in the absence of this phosphorylation.^{23,24} STAT3 plays an important role in tumorigenesis and its constitutive activation has been reported in several primary cancers and many oncogene-transformed cells.^{22,25-27} Importantly, we and others have also shown that this oncogene plays an important role in the response to chemotherapy treatment.^{28,29} Many studies have described the effect of STAT3 on cell transformation, apoptosis deregulation, and angiogenesis, using *in vitro* approaches, growth in two dimensions, in spheroid³⁰ or *in vivo* mice models.³¹ As an oncogene, STAT3 is expected to deregulate suppressive pathways³² but the transcription factor's effect on autophagy largely remains to be characterized. A study by Kroemer and colleagues has recently shown that the cytoplasmic form of STAT3 plays a key role in regulating this catabolic mechanism.³³ Using

a chemical library, they have observed that many drugs known to block the conventional activation of the transcription factor induce a significant activation of autophagy. Drugs such as Stattic, JSI-124, and WP1066 induce this mechanism and the effect was confirmed using either RNA interference or knockout cells. STAT3 inhibition leads to LC3⁺ dots, p62/SQSTM1 degradation, LC3 conversion, and autophagosome formation, which are all hallmarks of the autophagic program. In contrast, STAT3 overexpression induces a downregulation of this pathway and, most importantly, this was also observed when the authors used an Y705 mutated form of the transcription factor. Further suggesting a cytoplasmic role, no effect was noticed when the transcription factor was fused to a specific sequence that induces its constitutive nuclear localization. Interestingly, the authors identified several potential autophagy regulators such as HSP90, mTOR, and PKR kinase (EIF2AK2) within the STAT3 interactome. Through co-immunoprecipitation, mutagenesis, and molecular modeling, they show that STAT3 interacts with PKR in the cytoplasm and that this interaction is mediated by specific residues within its SH2 domain. In fact, it appears that this SH2 sequence is similar to a specific domain within the eIF2A translational regulator, one of the main targets of the PKR kinase. Consequently, the authors demonstrate that the PKR-eIF2A pathway is an important inducer of autophagy and that STAT3 inactivates this pathway through its binding to PKR and the inactivation of eIF2A phosphorylation. Interestingly, other inducers of autophagy such as palm oil are also regulated by the cytoplasmic form of the transcription factor and their effect on autophagy induction correlates with the dissociation of the STAT3-PKR complex. Other reports have proposed that STAT3 can regulate this pathway and as stated above we can speculate that this transcription factor regulates the transcription of ATG genes, perhaps in association with NFκB.²³ The study by Kroemer and colleagues describes the protein's nonconventional cytoplasmic role in the regulation of autophagy, further illustrating that STAT3 has functions in

the absence of Y705 phosphorylation and does not always act as a classic transcription factor.

This new study concerns the normal functions of STAT3 and does not address the oncogene's role in autophagy regulation. This is an important issue since this protein allows cell survival through the upregulation of proteins such as Bcl-XL, mcl1, and survivin. In addition, it has recently been suggested that the cytoplasmic form of STAT3, not phosphorylated on its Y705 residue, plays an important role in cells expressing the ras oncogene.³⁴ Considering the links between autophagy and cancer, it will be very interesting to determine the effect of the oncogenic form of STAT3 on autophagy. If we are convinced that its oncogenic form is phosphorylated on its 705 residue and dimeric, and that its main role is to activate cancer genes, then the nuclear form of STAT3 is not expected to interact with PKR. Consequently, tumor cells expressing this dimeric form should express an active PKR and show enhanced phosphorylation of eIF2- α . This would probably be the same if STAT3 interacts with NF κ B to exert its oncogenic activity. In this case, the formation of the complex is also expected to prevent the interaction with PKR since its main function would be to regulate the transcription of genes involved in cancer progression. Interestingly, it has recently been demonstrated that NF κ B plays an important role in the process of p27-mediated autophagy through the regulation of the skp2 protein.^{35,36} Whether this is related to its interaction with STAT3 and the consequent activation of PKR remains to be clarified. By allowing the cytoplasmic activation of the PKR kinase, these two oncogenic forms of STAT3 are expected to induce a normal activation of autophagy and therefore reduce the expression of p62/SQSTM1. Although this remains to be demonstrated, it can be suspected that some ATG genes are also targeted by the STAT3-NF κ B complex. If this hypothesis is correct, it will be interesting to determine if autophagy is a protective or tumor-suppressor mechanism when tumor cells express a conventional tyrosine-phosphorylated form of STAT3.

However, if we believe that the oncogenic form of STAT3 is cytoplasmic and

not phosphorylated on its Y705 residue, as recently shown in the case of ras-expressing cells, then we can speculate that STAT3 could in this case interact with PKR to block the induction of autophagy. In ras-expressing cells, it is striking to note that the cytoplasmic form of STAT3 has been described as a regulator of mitochondrial functions.³⁴ Given the very close links between autophagy, mitochondrial functions, and apoptosis, these observations could lead to the hypothesis that the STAT3-mediated inhibition of PKR during autophagy might somehow be connected to its mitochondrial activity in ras-transformed cells. In addition, if a monomeric form of STAT3 that interacts with PKR is effectively oncogenic, we expect that the resulting reduced autophagy would lead to an enhanced expression of p62/SQSTM1. As stated above, this protein activates the NF κ B pathway and a permanent autocrine loop induced by NF κ B maintains STAT3 activation in tumor cells.³⁷ In this context, the STAT3-mediated activation of p62/SQSTM1 would provide an additional means of reactivating NF κ B and maintaining a secreted survival loop.

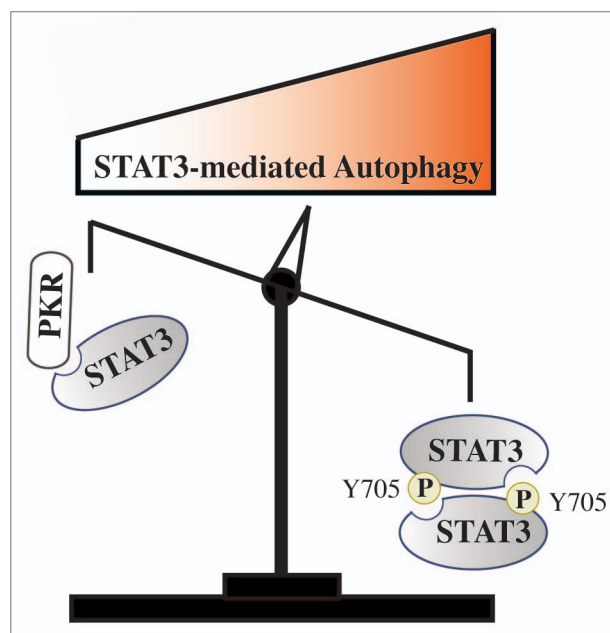


Figure 1. Schematic representation of autophagy regulation by STAT3 and proposed hypothesis. In normal conditions, latent cytoplasmic STAT3 binds to PKR, inhibits its activity, and reduces autophagy levels through eIF2 α inhibition. Conventional STAT3 oncogenic activation relies on its 705 phosphorylation, dimerization, and consequent nuclear translocation. Further experiments are therefore needed to determine if the STAT3 dimer releases the PKR kinase, which would then become available to phosphorylate eIF2 α and induce macroautophagy.

Given the very complex role of autophagy in cancer cells, we believe that it will be important to distinguish two cases in these further studies. During cancer initiation and senescence induction, the role of autophagy is probably not the same as in the functions in transformed cells that inactivate tumor suppressive pathways. Consequently, we also expect STAT3 phosphorylation, localization, and functions to vary during the successive stages of tumor progression. Therefore, further experiments are required to determine if STAT3 regulates autophagy to the same extent in primary cells, during senescence and in established cells that have escaped suppressive pathways (see Fig. 1 for a proposed hypothesis). The characterization of STAT3 in the different cell compartments based on its post-translational modifications and partners might be the key to understanding different STAT3 functions during the successive stages of cancer progression.

Finally, this new function of the STAT3 oncogene in autophagy might also play an important role in chemotherapy response. As stated above, we and others have shown that STAT transcription factors play an

important role in the response to treatment, either through their expected role on survival or through nonconventional functions on DNA repair or DNA damage signaling.^{29,38-40} Since autophagy can also be considered an adaptation mechanism allowing chemotherapy escape, it will be interesting to determine if autophagy inhibitors can potentiate the effects of the various drugs developed to inactivate the STAT3 pathway.⁴¹ These drugs might also be useful to prevent the survival effect of this oncogene in response to conventional genotoxic treatments. These are important issues to address, given the problem of tumor resistance in the field of oncology.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Work in our laboratory is supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (comité du Maine et Loire), the Rotary Club, the Cancerpole Grand Ouest, the Pays de la Loire region, and the French National Research Agency (ANR).

References

- White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:401-10; PMID:22534666; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3262>
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809-20; PMID:14638851
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15077-82; PMID:14657337; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2436255100>
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25:795-800; PMID:21498569; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016211>
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 2009; 137:1001-4; PMID:19524504; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>
- Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 13:343-54; PMID:18394557; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137:1062-75; PMID:19524509; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008; 133:1019-31; PMID:18555778; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 2010; 5:e9188; PMID:20169192; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>
- Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:51-7; PMID:20029423; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2772>
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602; PMID:9054499; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- White E, Lowe SW. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev* 2009; 23:784-7; PMID:19339684; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1795309>
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803; PMID:19279323; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.519709>
- Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012; 338:956-9; PMID:23112296; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1225967>
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13:132-41; PMID:21258367; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>
- Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* 2011; 42:23-35; PMID:21353614; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.009>
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; 24:2463-79; PMID:21078816; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25:460-70; PMID:21317241; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016311>
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74; PMID:21376230; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009; 136:823-37; PMID:19269363; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024>
- de Carné Trécesson S, Guillemin Y, Bélanger A, Bernard AC, Preisser L, Ravon E, et al. Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *J Biol Chem* 2011; 286:12825-38; PMID:21292770; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.186437>
- Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109:1139-42; PMID:11994401
- Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF-kappaB. *Genes Dev* 2007; 21:1396-408; PMID:17510282; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1553707>
- Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005; 65:939-47; PMID:15705894
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98:295-303; PMID:10458605; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81959-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81959-5)
- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:798-809; PMID:19851315; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2734>
- Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:97-105; PMID:14964307; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1275>
- Courapied S, Sellier H, de Carné Trécesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, et al. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem* 2010; 285:26765-78; PMID:20516069; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.092304>
- Vigneron A, Gamelin E, Coqueret O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Emel endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 2008; 68:815-25; PMID:18245483; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5115>
- Leslie K, Gao SP, Berishaj M, Podsypanina K, Ho H, Ivashkiv L, et al. Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation. *Breast Cancer Res* 2010; 12:R80; PMID:20929542; <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2725>
- Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15:91-102; PMID:19185844; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
- Barré B, Vigneron A, Perkins N, Roninson IB, Gamelin E, Coqueret O. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med* 2007; 13:4-11; PMID:17118707; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2006.11.001>
- Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* 2012; 48:667-80; PMID:23084476; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.013>
- Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Lerner AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 2009; 324:1713-6; PMID:19556508; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1171721>
- Barré B, Coqueret O, Perkins ND. Regulation of activity and function of the p52 NF-B subunit following DNA damage. *Cell Cycle* 2010; 9:4795-804; PMID:21131783; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.24.14245>
- Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell* 2010; 38:524-38; PMID:20513428; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.018>

37. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009; 139:693-706; PMID:19878981; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
38. Courapied S, Cherier J, Vigneron A, Troadec MB, Giraud S, Valo I, et al. Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription factor. *Mol Cancer* 2010; 9:205; PMID:20682043; <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-205>
39. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol* 2010; 91:506-14; PMID:20804538; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00734.x>
40. Townsend PA, Cragg MS, Davidson SM, McCormick J, Barry S, Lawrence KM, et al. STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* 2005; 118:1629-39; PMID:15784679; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01728>
41. Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol* 2012; 30:1005-14; PMID:22355058; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.8907>

6. BIBLIOGRAPHIE

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438–1449. doi:10.1172/JCI38019DS1
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 15(7), 1–15. doi:10.1038/ncb2784
- Adams, P. D. (2009). Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Molecular Cell*, 36(1), 2–14. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.021
- Allan, L. A., & Clarke, P. R. (2007). Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis. *Molecular Cell*, 26(2), 301–310. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.019
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67(9), 545–554. doi:10.1002/cm.20472
- An, J., Huang, Y.-C., Xu, Q.-Z., Zhou, L.-J., Shang, Z.-F., Huang, B., et al. (2010). DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 18. doi:10.1186/1471-2199-11-18
- Anderson, E. C., Hessman, C., Levin, T. G., Monroe, M. M., & Wong, M. H. (2011). The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers*, 3(1), 319–339. doi:10.3390/cancers3010319
- Andreassen, P. R., Lacroix, F. O. B., Lohez, O. D., & Margolis, R. L. (2001a). Neither p21WAF1 Nor 14-3-3 Prevents G2 Progression to Mitotic Catastrophe in Human Colon Carcinoma Cells after DNA Damage, But p21WAF1 Induces Stable G1 Arrest in Resulting Tetraploid Cells. *Cancer Research*, 61, 7660–7668.
- Andreassen, P. R., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., & Margolis, R. L. (2001b). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1315–1328.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B. P., Thomas, C., et al. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell*, 14(1), 79–89. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.005
- Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., et al. (2006). Chromosomal instability by β -catenin/TCF transcription in APC or β -catenin mutant cells. *Oncogene*, 26(24), 3511–3520. doi:10.1038/sj.onc.1210141
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., & Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *The EMBO Journal*, 18(5), 1223–1234. doi:10.1093/emboj/18.5.1223
- Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y., & Perreault, N. (2007). Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage. *Gastroenterology*, 133(3), 887–896. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.066

- Bae, J. (2000). MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25255–25261. doi:10.1074/jbc.M909826199
- Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., et al. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death and Disease*, 5, e1291. doi:10.1038/cddis.2014.251
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244(4901), 217–221.
- Barker, N. (2013). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 19–33. doi:10.1038/nrm3721
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., et al. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457(7229), 608–612. doi:10.1038/nature07602
- Barker, N., Tan, S., & Clevers, H. (2013). Lgr proteins in epithelial stem cell biology. *Development*, 140(12), 2484–2494. doi:10.1242/dev.083113
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(6), 738–747.
- Bartholomew, J. N., Volonte, D., & Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 Regulates the Antagonistic Pleiotropic Properties of Cellular Senescence through a Novel Mdm2/p53-Mediated Pathway. *Cancer Research*, 69(7), 2878–2886. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2857
- Basili, S., & Moro, S. (2009). Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(5), 555–574. doi:10.1517/13543770902773437
- Basu, D., Reyes-Mugica, M., & Rebbaa, A. (2012). Role of the Beta Catenin Destruction Complex in Mediating Chemotherapy-Induced Senescence-Associated Secretory Phenotype. *PLoS ONE*, 7(12), e52188. doi:10.1371/journal.pone.0052188.s003
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*, 22(16), 4212–4222. doi:10.1093/emboj/cdg417
- Bhonde, M. R., Hanski, M.-L., Notter, M., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Zeitz, M., & Hanski, C. (2005). Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. *Oncogene*. doi:10.1038/sj.onc.1209017
- Bingle, C. D. (2000). Exon Skipping in Mcl-1 Results in a Bcl-2 Homology Domain 3 Only Gene Product That Promotes Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22136–22146. doi:10.1074/jbc.M909572199
- Blagosklonny, M. V. (2007). Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(1), 70–74.
- Bodmer, W., & Loeb, L. A. (2008). Genetic Instability Is Not a Requirement for Tumor Development. *Cancer Research*, 68(10), 3558–3561. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6544
- Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., et al. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74(4), 597–608.
- Boisvert-Adamo, K., Longmate, W., Abel, E. V., & Aplin, A. E. (2009). Mcl-1 Is Required for Melanoma Cell Resistance to Anoikis. *Molecular Cancer Research*, 7(4), 549–556. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0358

- Bolesta, E., Pfannenstiel, L. W., Demelash, A., Lesniewski, M. L., Tobin, M., Schlanger, S. E., et al. (2012). Inhibition of Mcl-1 Promotes Senescence in Cancer Cells: Implications for Preventing Tumor Growth and Chemotherapy Resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10), 1879–1892. doi:10.1128/MCB.06214-11
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., & Vogelstein, B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327(6120), 293–297. doi:10.1038/327293a0
- Bossi, G., Lapi, E., Strano, S., Rinaldo, C., Blandino, G., & Sacchi, A. (2006). Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene*, 25(2), 304–309. doi:10.1038/sj.onc.1209026
- Boutros, R., Dozier, C., & Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(2), 185–191. doi:10.1016/j.ceb.2006.02.003
- Brabletz, T. (2012). To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 12(6), 425–436. doi:10.1038/nrc3265
- Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., et al. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & Development*, 21(5), 525–530. doi:10.1101/gad.415507
- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., & Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *The EMBO Journal*, 22(20), 5323–5335. doi:10.1093/emboj/cdg542
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490–1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
- Brown, D. C., & Gatter, K. C. (2002). Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, 40(1), 2–11.
- Burrell, R. A., & Swanton, C. (2014). Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular Oncology*, 8(6), 1095–1111. doi:10.1016/j.molonc.2014.06.005
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I. B.-N., Balacescu, O., Tanaselia, C., Ursu, M., Gog, A., et al. (2009). Clinical and pharmacokinetics study of oxaliplatin in colon cancer patients. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases : JGLD*, 18(1), 39–43.
- Cahu, J., Bustany, S., & Sola, B. (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death and Disease*, 3, e446. doi:10.1038/cddis.2012.183
- Cakouros, D., Isenmann, S., Cooper, L., Zannettino, A., Anderson, P., Glackin, C., & Gronthos, S. (2012). Twist-1 Induces Ezh2 Recruitment Regulating Histone Methylation along the Ink4A/Arf Locus in Mesenchymal Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(8), 1433–1441. doi:10.1128/MCB.06315-11
- Campbell, C. J. V., Lee, J. B., Levadoux-Martin, M., Wynder, T., Xenocostas, A., Leber, B., & Bhatia, M. (2010a). The human stem cell hierarchy is defined by a functional dependence on Mcl-1 for self-renewal capacity. *Blood*, 116(9), 1433–1442. doi:10.1182/blood-2009-12-258095
- Campbell, K. J., Bath, M. L., Turner, M. L., Vandenberg, C. J., Bouillet, P., Metcalf, D., et al. (2010b). Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood*, 116(17), 3197–3207. doi:10.1182/blood-2010-04-281071
- Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(1), 107–112. doi:10.1016/j.gde.2010.10.005

- Canino, C., Mori, F., Cambria, A., Diamantini, A., Germoni, S., Alessandrini, G., et al. (2011). SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2011.485
- Carduner, L., Picot, C. R., Leroy-Dudal, J., Blay, L., Kellouche, S., & Carreiras, F. (2014). Cell cycle arrest or survival signaling through α_v integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Experimental Cell Research*, 320(2), 329–342. doi:10.1016/j.yexcr.2013.11.011
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), 789–803. doi:10.1038/nrm3474
- Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C. D., Costa, M., et al. (2004). Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 50(2), 173–179. doi:10.1016/j.phrs.2004.01.006
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., & Ducommun, B. (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(9), 1233–1238.
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564. doi:10.1126/science.1203543
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563–572. doi:10.1038/nrc865
- Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010). Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Ygast*, 138(6), 2029–2043.e10. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057
- Chang, B. D., Xuan, Y., Broude, E. V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., & Roninson, I. B. (1999). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, 18(34), 4808–4818. doi:10.1038/sj.onc.1203078
- Chang, B.-D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., & Roninson, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 389–394. doi:10.1073/pnas.012602599
- Chen, D., Padiernos, E., Ding, F., Lossos, I. S., & Lopez, C. D. (2004). Apoptosis-stimulating protein of p53-2 (ASPP2/53BP2L) is an E2F target gene. *Cell Death and Differentiation*, 12(4), 358–368. doi:10.1038/sj.cdd.4401536
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., et al. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17(3), 393–403. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030
- Chester, J. D., Joel, S. P., Cheeseman, S. L., Hall, G. D., Braun, M. S., Perry, J., et al. (2003). Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral cyclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(6), 1125–1132. doi:10.1200/JCO.2003.08.049
- Chibaudel, B., Tournigand, C., André, T., & de Gramont, A. (2012). Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4(2), 75–89. doi:10.1177/1758834011431592
- Chien, Y., & Lowe, S. W. (2008). Secreting tumor suppression. *Cell*, 132(3), 339–341. doi:10.1016/j.cell.2008.01.022
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence

- and enhances chemosensitivity. *Genes & Development*, 25(20), 2125–2136. doi: 10.1101/gad.17276711
- Chu, R., Terrano, D. T., & Chambers, T. C. (2012). Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration. *Biochemical Pharmacology*, 83(2), 199–206. doi:10.1016/j.bcp.2011.10.008
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944–13949. doi:10.1073/pnas.0506654102
- Colak, S., Zimmerlin, C. D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P. R., Grandela, C. M., et al. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(7), 1170–1177. doi:10.1038/cdd.2014.37
- Collins, N. L., Reginato, M. J., Paulus, J. K., Sgroi, D. C., Labaer, J., & Brugge, J. S. (2005). G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5282–5291. doi:10.1128/MCB.25.12.5282-5291.2005
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010a). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99–118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C. M., Parrinello, S., et al. (2010b). A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen. *PLoS ONE*, 5(2), e9188. doi: 10.1371/journal.pone.0009188.s009
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., et al. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), e301. doi:10.1371/journal.pbio.0060301.st002
- Courapied, S., Cherier, J., Vigneron, A., Troadec, M.-B., Giraud, S., Valo, I., et al. (2010). Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription Factor. *Molecular Cancer*, 9(1), 205. doi: 10.1186/1476-4598-9-205
- Cully, M., You, H., Levine, A. J., & Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6(3), 184–192. doi:10.1038/nrc1819
- Czabotar, P. E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W. D., et al. (2013). Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell*, 152(3), 519–531. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.031
- Dai, C., & Gu, W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 16(11), 528–536. doi:10.1016/j.molmed.2010.09.002
- Dai, Y., Wilson, G., Huang, B., Peng, M., Teng, G., Zhang, D., et al. (2014). Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death and Disease*, 5(4), e1170–9. doi:10.1038/cddis.2014.137
- Daley, J. M., & Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 34(8), 1380–1388. doi:10.1128/MCB.01639-13
- Dallas, N. A., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Gaur, P., van Buren, G., et al. (2009). Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype, and

- Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition. *Cancer Research*, 69(5), 1951–1957. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2023
- Davoli, T., & de Lange, T. (2011). The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 585–610. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154234
- de Carné Trécesson, S., Guillemain, Y., Bélanger, A., bernard, A.-C., Preisser, L., Ravon, E., et al. (2011). Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 12825–12838. doi:10.1074/jbc.M110.186437
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 97–110. doi:10.1038/nrc3447
- De Wever, O. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.03-1110fje
- Di Franco, S., Todaro, M., Dieli, F., & Stassi, G. (2013). Colorectal cancer defeating? Challenge accepted! *Molecular Aspects of Medicine*. doi:10.1016/j.mam.2013.07.001
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., et al. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell*, 16(6), 979–990. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.003
- Eichhorn, J. M., Sakurikar, N., Alford, S. E., Chu, R., & Chambers, T. C. (2013). Critical role of anti-apoptotic Bcl-2 protein phosphorylation in mitotic death. *Cell Death and Disease*, 4(10), e834–8. doi:10.1038/cddis.2013.360
- Eng, C. (2001). To be or not to BMP. *Nature Genetics*, 28(2), 105–107. doi:10.1038/88802
- Ewing, G. P., & Goff, L. W. (2011). The Insulin-like Growth Factor Signaling Pathway as a Target for Treatment of Colorectal Carcinoma. *Clinical Colorectal Cancer*, 9(4), 219–223. doi:10.3816/CCC.2010.n.032
- Ewings, K. E., Hadfield-Moorhouse, K., Wiggins, C. M., Wickenden, J. A., Balmanno, K., Gilley, R., et al. (2007). ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *The EMBO Journal*, 26(12), 2856–2867. doi:10.1038/sj.emboj.7601723
- Fang, L., Igarashi, M., Leung, J., Sugrue, M. M., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (1999). p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene*, 18(18), 2789–2797. doi:10.1038/sj.onc.1202615
- Fearon, E. R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 479–507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235
- Fearon, E. R., & Dang, C. V. (1999). Cancer genetics: tumor suppressor meets oncogene. *Current Biology : CB*, 9(2), R62–5.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., & Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, 3(8-9), 959–967. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.024
- Finkin, S., Aylon, Y., Anzi, S., Oren, M., & Shaulian, E. (2008). Fbw7 regulates the activity of endoreduplication mediators and the p53 pathway to prevent drug-induced polyploidy. *Oncogene*, 27(32), 4411–4421. doi:10.1038/onc.2008.77

- Fiori, M. E., Barbini, C., Haas, T. L., Marroncelli, N., Patrizii, M., Biffoni, M., & De Maria, R. (2014). Antitumor effect of miR-197 targeting in p53 wild-type lung cancer. *Cell Death and Differentiation*, 21(5), 774–782. doi:10.1038/cdd.2014.6
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(7), 867–871.
- Fodde, R., & Brabletz, T. (2007). Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 150–158. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.007
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., et al. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology*, 3(4), 433–438. doi:10.1038/35070129
- Foley, E. A., & Kapoor, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(1), 25–37. doi:10.1038/nrm3494
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature Cell Biology*, 435(7044), 964–968. doi:10.1038/nature03589
- Fre, S., Pallavi, S. K., Huyghe, M., Laé, M., Janssen, K.-P., Robine, S., et al. (2009). Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci*, 106(15), 6309–6314. doi:10.1073/pnas.0900427106
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, 16(5), 238–246. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003
- Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal*, 1–13. doi:10.1038/emboj.2011.69
- Frisch, S. M., & Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5), 555–562.
- Galiatsatos, P., & Foulkes, W. D. (2006). Familial Adenomatous Polyposis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(2), 385–398. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x
- Gall, T. M. H., & Frampton, A. E. (2013). Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *Journal of Clinical Pathology*, 66(11), 928–932. doi:10.1136/jclinpath-2013-201768
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noel, B., Hickman, J. A., et al. (2009). Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *The Journal of Cell Biology*, 185(2), 279–290. doi:10.1083/jcb.200809153
- Galluzzi, L., VITALE, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*, 14(2), 111–122. doi:10.1016/j.ccr.2008.07.002
- Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science*, 122(15), 2579–2585. doi:10.1242/jcs.039719
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M. L., Pitter, K., Bird, G. H., Katz, S. G., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 455(7216), 1076–1081. doi:10.1038/nature07396
- Gavert, N., Vivanti, A., Hazin, J., Brabletz, T., & Ben-Ze'ev, A. (2011). L1-Mediated Colon Cancer Cell Metastasis Does Not Require Changes in EMT and Cancer Stem Cell

- Markers. *Molecular Cancer Research*, 9(1), 14–24. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0406
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., et al. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 366(10), 883–892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205
- Grande, L., Bretones, G., Rosa-Garrido, M., Garrido-Martin, E. M., Hernandez, T., Fraile, S., et al. (2012). Transcription factors Sp1 and p73 control the expression of the proapoptotic protein NOXA in the response of testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26495–26505. doi: 10.1074/jbc.M112.376319
- Gregorieff, A. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Development*, 19(8), 877–890. doi:10.1101/gad.1295405
- Gulhati, P., Bowen, K. A., Liu, J., Stevens, P. D., Rychahou, P. G., Chen, M., et al. (2011). mTORC1 and mTORC2 Regulate EMT, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer via RhoA and Rac1 Signaling Pathways. *Cancer Research*, 71(9), 3246–3256. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4058
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., & Lander, E. S. (2009). Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*, 138(4), 645–659. doi:10.1016/j.cell.2009.06.034
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., et al. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 17154–17160. doi: 10.1074/jbc.M112401200
- Hardwick, J. C. H., van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Ballester, I., Van Den Brande, J. M. H., Keller, J. J., et al. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology*, 126(1), 111–121. doi:10.1053/j.gastro.2003.10.067
- Hardwick, J. C., Kodach, L. L., Offerhaus, G. J., & van den Brink, G. R. (2008). Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 806–812. doi:10.1038/nrc2467
- Harley, M. E., Allan, L. A., Sanderson, H. S., & Clarke, P. R. (2010). Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *The EMBO Journal*, 29(14), 2407–2420. doi:10.1038/emboj.2010.112
- HAS, INCA. (2012). Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer colorectal Adénocarcinome. *Guide - Affection De Longue Durée*, www.has-sante.fr.
- Hayashi, M. T., & Karlseder, J. (2013). DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene*, 32(39), 4593–4601. doi:10.1038/onc.2012.615
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nature Genetics*, 36(10), 1117–1121. doi:10.1038/ng1430
- Hegde, G. V., la Cruz, de, C., Eastham-Anderson, J., Zheng, Y., Sweet-Cordero, E. A., & Jackson, E. L. (2012). Residual Tumor Cells That Drive Disease Relapse after Chemotherapy Do Not Have Enhanced Tumor Initiating Capacity. *PLoS ONE*, 7(10), e45647. doi:10.1371/journal.pone.0045647.t002
- Heijink, A. M., Krajewska, M., & van Vugt, M. A. T. M. (2013). The DNA damage response during mitosis. *Mutation Research*, 750(1-2), 45–55. doi:10.1016/j.mrfmmm.2013.07.003
- Hershko, T., & Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 Mediates Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8627–8634. doi:10.1074/jbc.M312866200

- Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., & Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death and Differentiation*, 12(4), 377–383. doi:10.1038/sj.cdd.4401575
- Heyer, W.-D. (2004). Recombination: Holliday Junction Resolution and Crossover Formation. *Current Biology*, 14(2), R56–R58. doi:10.1016/j.cub.2003.12.043
- Hörndler, C., Gallego, R., Garcia-Albéniz, X., Alonso-Espinaco, V., Alonso, V., Escudero, P., et al. (2011). Co-expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and phosphorylated insulin growth factor receptor I (pIGF-1R) correlates with poor prognosis in patients with wild-type KRAS treated with cetuximab or panitumumab: A GEMCAD study. *Cancer Biology & Therapy*, 11(2), 177–183. doi:10.4161/cbt.11.2.13839
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., & Liu, L. F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14873–14878. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=2997227&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Huang, F., Xu, L. A., & Khambata-Ford, S. (2012). Correlation between Gene Expression of IGF-1R Pathway Markers and Cetuximab Benefit in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(4), 1156–1166. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1135
- Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Human Mutation*, 21(3), 271–276. doi:10.1002/humu.10175
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., Wang, G., & Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci*, 108(4), 1397–1402. doi:10.1073/pnas.1018898108
- Inuzuka, H., Fukushima, H., Shaik, S., Liu, P., Lau, A. W., & Wei, W. (2011a). Mcl-1 ubiquitination and destruction. *Oncotarget*, 2(3), 239–244.
- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R. S., et al. (2011b). SCFFBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature*, 470(7336), 104–109. doi:10.1038/nature09732
- Irie, H. Y., Shrestha, Y., Selfors, L. M., Frye, F., Iida, N., Wang, Z., et al. (2010). PTK6 Regulates IGF-1-Induced Anchorage-Independent Survival. *PLoS ONE*, 5(7), e11729. doi:10.1371/journal.pone.0011729.s006
- Izumiyama, M., Kabashima, A., Higuchi, H., Igarashi, T., Sakai, G., Izumiyama, H., et al. (2012). Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Research*, 32(9), 3847–3853.
- Jackson, A. L., & Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research*, 477(1-2), 7–21.
- Jaeger, E., Leedham, S., Lewis, A., Segditsas, S., Becker, M., Cuadrado, P. R., et al. (2012). Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist. *Nature Genetics*, 44(6), 699–703. doi:10.1038/ng.2263
- Jang, B. G., Lee, B. L., & Kim, W. H. (2013). Distribution of LGR5+ Cells and Associated Implications during the Early Stage of Gastric Tumorigenesis. *PLoS ONE*, 8(12), e82390. doi:10.1371/journal.pone.0082390.s012
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 277–300. doi:10.3322/caac.20073
- Jia, J., Zhang, W., Liu, J.-Y., Chen, G., Liu, H., Zhong, H.-Y., et al. (2012). Epithelial Mesenchymal Transition Is Required for Acquisition of Anoikis Resistance and Metastatic Potential in Adenoid Cystic Carcinoma. *PLoS ONE*, 7(12), e51549. doi:10.1371/journal.pone.0051549.s004

- Jiang, P., Du, W., Heese, K., & Wu, M. (2006). The Bad Guy Cooperates with Good Cop p53: Bad Is Transcriptionally Up-Regulated by p53 and Forms a Bad/p53 Complex at the Mitochondria To Induce Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), 9071–9082. doi:10.1128/MCB.01025-06
- Johmura, Y., Shimada, M., Misaki, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., et al. (2014). Necessary and Sufficient Role for a Mitosis Skip in Senescence Induction. *Molecular Cell*, 55(1), 73–84. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.003
- Jubb, A. M., Chalasani, S., Frantz, G. D., Smits, R., Grabsch, H. I., Kavi, V., et al. (2006). Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene*, 25(24), 3445–3457. doi:10.1038/sj.onc.1209382
- Kao, S.-H., Wang, W.-L., Chen, C.-Y., Chang, Y.-L., Wu, Y.-Y., Wang, Y.-T., et al. (2014). GSK3 β controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene*, 33(24), 3172–3182. doi:10.1038/onc.2013.279
- Kawabata, T., Tanimura, S., Asai, K., Kawasaki, R., Matsumaru, Y., & Kohno, M. (2012). Up-regulation of Pro-apoptotic Protein Bim and Down-regulation of Anti-apoptotic Protein Mcl-1 Cooperatively Mediate Enhanced Tumor Cell Death Induced by the Combination of ERK Kinase (MEK) Inhibitor and Microtubule Inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10289–10300. doi:10.1074/jbc.M111.319426
- Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H., & Sato, K. (1991). Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Research*, 51(16), 4187–4191.
- Kazanjian, A., & Shroyer, N. F. (2011). NOTCH Signaling and ATOH1 in Colorectal Cancers. *Current Colorectal Cancer Reports*, 7(2), 121–127. doi:10.1007/s11888-011-0090-5
- Kelly, G. L., Grabow, S., Glaser, S. P., Fitzsimmons, L., Aubrey, B. J., Okamoto, T., et al. (2014). Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53. *Genes & Development*, 28(1), 58–70. doi:10.1101/gad.232009.113
- Kemper, K., Grandela, C., & Medema, J. P. (2010). Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells. *Oncotarget*, 1(6), 387–395.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254. doi:10.1038/85798
- Kim, J. H., Yoon, S. Y., Kim, C.-N., Joo, J. H., Moon, S. K., Choe, I. S., et al. (2004). The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Letters*, 203(2), 217–224. doi:10.1016/j.canlet.2003.07.009
- Kim, J.-H., Sim, S.-H., Ha, H.-J., Ko, J.-J., Lee, K., & Bae, J. (2009). MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Letters*, 583(17), 2758–2764. doi:10.1016/j.febslet.2009.08.006
- Kobayashi, S., Yamada-Okabe, H., Suzuki, M., Natori, O., Kato, A., Matsubara, K., et al. (2012). LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative cells and are Capable of Tumor Reconstitution. *Stem Cells*, 30(12), 2631–2644. doi:10.1002/stem.1257
- Kodach, L. L., Bleuming, S. A., Musler, A. R., Peppelenbosch, M. P., Hommes, D. W., van den Brink, G. R., et al. (2008). The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer*, 112(2), 300–306. doi:10.1002/cncr.23160
- Koo, B.-K., & Clevers, H. (2014). Stem Cells Marked by the R-Spondin Receptor LGR5. *Ygast*, 147(2), 289–302. doi:10.1053/j.gastro.2014.05.007

- Koo, K. H., Kim, H., Bae, Y.-K., Kim, K., Park, B.-K., Lee, C.-H., & Kim, Y.-N. (2013). Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell Death and Disease*, 4(6), e693–11. doi:10.1038/cddis.2013.223
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., & Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16 ink4a. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(3), 457–468. doi:10.4161/cc.10.3.14707
- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15418–15423. doi:10.1073/pnas.0707210104
- Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., van den Berg, A., Suurmeijer, A. J., et al. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3594–3605. doi:10.1172/JCI41939DS1
- Krausova, M., & Korinek, V. (2014). Cellular Signalling. *Cellular Signalling*, 26(3), 570–579. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.032
- Kreso, A., van Galen, P., Pedley, N. M., Lima-Fernandes, E., Frelin, C., Davis, T., et al. (2013). Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nature Medicine*, 20(1), 29–36. doi:10.1038/nm.3418
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., et al. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, 134(4), 657–667. doi:10.1016/j.cell.2008.06.049
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12072–12077. doi:10.1073/pnas.211053698
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*, 24(22), 2463–2479. doi:10.1101/gad.1971610
- Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y., & Bapat, S. A. (2009). Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. *Stem Cells*, 27(9), 2059–2068. doi:10.1002/stem.154
- Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., & Villunger, A. (2008). Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death and Differentiation*, 15(6), 977–987. doi:10.1038/cdd.2008.37
- Lai, A. Z., Abella, J. V., & Park, M. (2009). Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in Cell Biology*, 19(10), 542–551. doi:10.1016/j.tcb.2009.07.002
- Langan, R. C., Mullinax, J. E., Raiji, M. T., Upham, T., Summers, T., Stojadinovic, A., & Avital, I. (2013). Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *Journal of Cancer*, 4(3), 241–250. doi:10.7150/jca.5832
- Lanigan, F., Geraghty, J. G., & Bracken, A. P. (2011). Transcriptional regulation of cellular senescence. *Oncogene*, 30(26), 2901–2911. doi:10.1038/onc.2011.34
- Laurent-Puig, P., Agostini, J., & Maley, K. (2010). [Colorectal oncogenesis]. *Bulletin Du Cancer*, 97(11), 1311–1321. doi:10.1684/bdc.2010.1216
- Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, 29(38), 5221–5230. doi:10.1038/onc.2010.283

- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., et al. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
- Lee, J., Kim, J. A., Margolis, R. L., & Fotedar, R. (2010). Substrate degradation by the anaphase promoting complex occurs during mitotic slippage. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(9), 1792–1801.
- LEOW, C. C., POLAKIS, P., & GAO, W.-Q. (2005). A Role for Hath1, a bHLH Transcription Factor, in Colon Adenocarcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1059(1), 174–183. doi:10.1196/annals.1339.048
- LEOW, C. C., Romero, M. S., Ross, S., POLAKIS, P., & GAO, W.-Q. (2004). Hath1, down-regulated in colon adenocarcinomas, inhibits proliferation and tumorigenesis of colon cancer cells. *Cancer Research*, 64(17), 6050–6057. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0290
- Lerner, M., Haneklaus, M., Harada, M., & Grandér, D. (2012). MiR-200c regulates Noxa expression and sensitivity to proteasomal inhibitors. *PLoS ONE*, 7(5), e36490. doi: 10.1371/journal.pone.0036490
- Li, D.-W., Tang, H.-M., Fan, J.-W., Yan, D.-W., Zhou, C.-Z., Li, S.-X., et al. (2010). Expression level of Bmi-1 oncoprotein is associated with progression and prognosis in colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(7), 997–1006. doi:10.1007/s00432-009-0745-7
- Lièvre, A., Blons, H., & Laurent-Puig, P. (2010). Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*, 29(21), 3033–3043. doi:10.1038/onc.2010.89
- Lin, Y.-C., Chen, Y.-N., Lin, K.-F., Wang, F.-F., Chou, T.-Y., & Chen, M.-Y. (2014). Association of p21 with NF- κ B suppresses the expression of Polo-like kinase 1 and prevents mitotic death in response to DNA damage. *Cell Death and Disease*, 5, e987. doi:10.1038/cddis.2013.527
- Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*, 67(7), 3117–3126. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3452
- Liu, J., Uygur, B., Zhang, Z., Shao, L., Romero, D., Vary, C., et al. (2010). Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression. *The Prostate*, 70(16), 1768–1777. doi:10.1002/pros.21213
- Loeb, L. A., Bielas, J. H., Beckman, R. A., & Bodmer, I. W. (2008). Cancers Exhibit a Mutator Phenotype: Clinical Implications. *Cancer Research*, 68(10), 3551–3557. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5835
- Lomonosova, E., & Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S2–19. doi:10.1038/onc.2009.39
- Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nature Publishing Group*, 7(11), 861–869. doi: 10.1038/nrc2248
- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 136(5), 823–837. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024
- Maamer-Azzabi, A., Ndozangue-Touriguine, O., & Bréard, J. (2013). Metastatic SW620 colon cancer cells are primed for death when detached and can be sensitized to anoikis by the BH3-mimetic ABT-737. *Cell Death and Disease*, 4, e801. doi: 10.1038/cddis.2013.328
- Madison, B. B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X. T., & Gumucio, D. L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development*, 132(2), 279–289. doi:10.1242/dev.01576
- Mah, L.-J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. doi:10.1038/leu.2010.6

- Mak, A. B., Nixon, A. M. L., Kittanakom, S., Stewart, J. M., Chen, G. I., Curak, J., et al. (2012). Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *CellReports*, 2(4), 951–963. doi:10.1016/j.celrep.2012.09.016
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Mansi, L., Viel, E., Curtit, E., Medioni, J., & Le Tourneau, C. (2011). [Targeting the RAS signalling pathway in cancer]. *Bulletin Du Cancer*, 98(9), 1019–1028. doi:10.1684/bdc.2011.1380
- Margolis, R. L., Lohez, O. D., & Andreassen, P. R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(4), 673–683. doi:10.1002/jcb.10411
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449–2460. doi:10.1056/NEJMr0804588
- Martin, M. J., Melnyk, N., Pollard, M., Bowden, M., Leong, H., Podor, T. J., et al. (2006). The Insulin-Like Growth Factor I Receptor Is Required for Akt Activation and Suppression of Anoikis in Cells Transformed by the ETV6-NTRK3 Chimeric Tyrosine Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), 1754–1769. doi:10.1128/MCB.26.5.1754-1769.2006
- Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Scott, C. L., Wei, A. H., Cory, S., Huang, D. C. S., & Roberts, A. W. (2008). In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas. *ProcNatlAcadSci*, 105(46), 17961–17966. doi:10.1073/pnas.0809957105
- Massagué, J. (2012). signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. doi:10.1038/nrm3434
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., & Green, D. R. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Apoptosis by Destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, 21(6), 749–760. doi:10.1016/j.molcel.2006.02.009
- Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*, 127(7), 1369–1378. doi:10.1242/jcs.138057
- McKenzie, L., King, S., Marcar, L., Nicol, S., Dias, S. S., Schumm, K., et al. (2010). p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(20), 4200–4212. doi:10.4161/cc.9.20.13532
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318–326. doi:10.1038/nature10212
- Medema, R. H., & Macûrek, L. (2011). Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, 1–13. doi:10.1038/onc.2011.451
- Mikhailov, A., Cole, R. W., & Rieder, C. L. (2002). DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Current Biology : CB*, 12(21), 1797–1806.
- Mittal, M. K., Singh, K., Misra, S., & Chaudhuri, G. (2011). SLUG-induced elevation of D1 cyclin in breast cancer cells through the inhibition of its ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 469–479. doi:10.1074/jbc.M110.164384
- Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., et al. (1999). Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*, 18(20), 3098–3103. doi:10.1038/sj.onc.1202642

- Moldoveanu, T., Grace, C. R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., et al. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nature Publishing Group*, 20(5), 589–597. doi:10.1038/nsmb.2563
- Moore, M. J., Wang, Q., Kennedy, C. J., & Silver, P. A. (2010). An Alternative Splicing Network Links Cell-Cycle Control to Apoptosis. *Cell*, 142(4), 625–636. doi:10.1016/j.cell.2010.07.019
- Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 26(42), 6133–6140. doi:10.1038/sj.onc.1210436
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science*, 98(10), 1512–1520. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00550.x
- Muller, P. A. J., & Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15(1), 2–8. doi:10.1038/ncb2641
- Muller, P. A. J., Caswell, P. T., Doyle, B., Iwanicki, M. P., Tan, E. H., Karim, S., et al. (2009). Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell*, 139(7), 1327–1341. doi:10.1016/j.cell.2009.11.026
- Muller, P. A. J., Trinidad, A. G., Timpson, P., Morton, J. P., Zanivan, S., van den Berghe, P. V. E., et al. (2012). Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Cell*, 150(5), 1252–1265. doi:10.1016/j.cell.2012.10.026
- Muranen, T., Selfors, L. M., Worster, D. T., Iwanicki, M. P., Song, L., Morales, F. C., et al. (2012). Inhibition of PI3K/mTOR Leads to Adaptive Resistance in Matrix-Attached Cancer Cells. *Cell*, 150(2), 227–239. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.024
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., et al. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716.
- Narumiya, S., Tanji, M., & Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 65–76. doi:10.1007/s10555-008-9170-7
- Naujokat, C., & Steinhart, R. (2012). Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(12), 1–17. doi:10.1155/2012/5472.CAN-10-4136
- Naylor, R. M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2012). Senescent Cells: A Novel Therapeutic Target for Aging and Age-Related Diseases. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 93(1), 105–116. doi:10.1038/clpt.2012.193
- Ng, K. P., Hillmer, A. M., Chuah, C. T. H., Juan, W. C., Ko, T. K., Teo, A. S. M., et al. (2012). A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature Medicine*, 18(4), 521–528. doi:10.1038/nm.2713
- Nieto, M. A., & Cano, A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in Cancer Biology*, 22(5-6), 361–368. doi:10.1016/j.semcancer.2012.05.003
- O'Brien, C. A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., et al. (2012). ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell*, 21(6), 777–792. doi:10.1016/j.ccr.2012.04.036
- Ocaña, O. H., Córcoles, R., Fabra, Á., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., et al. (2012). Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 21(1), 1–16. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.012
- Ogino, S., Lochhead, P., Giovannucci, E., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S., & Chan, A. T. (2014). Discovery of colorectal cancer PIK3CA mutation as potential predictive

- biomarker: power and promise of molecular pathological epidemiology. *Oncogene*, 33(23), 2949–2955. doi:10.1038/onc.2013.244
- Okamoto, K., Ishiguro, T., Midorikawa, Y., Ohata, H., Izumiya, M., Tsuchiya, N., et al. (2012). miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *The EMBO Journal*, 31(7), 1752–1763. doi:10.1038/emboj.2012.25
- Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., & Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci*, 106(40), 17031–17036. doi:10.1073/pnas.0905299106
- Osman, F., & Whitby, M. C. (2007). Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair*, 6(7), 1004–1017. doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.019
- Panier, S., & Boulton, S. J. (2013). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 7–18. doi:10.1038/nrm3719
- Panopoulos, A., Pacios-Bras, C., Choi, J., Yenjerla, M., Sussman, M. A., Fotedar, R., & Margolis, R. L. (2014). Failure of cell cleavage induces senescence in tetraploid primary cells. *Molecular Biology of the Cell*. doi:10.1091/mbc.E14-03-0844
- Pathmanathan, N., & Balleine, R. L. (2013). Ki67 and proliferation in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 66(6), 512–516. doi:10.1136/jclinpath-2012-201085
- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., et al. (2011). Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells. *Ygast*, 140(4), 1230–1240.e7. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.005
- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., et al. (2009). A Two-Step Model for Colon Adenoma Initiation and Progression Caused by APC Loss. *Cell*, 137(4), 623–634. doi:10.1016/j.cell.2009.02.037
- Poele, te, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., & Joel, S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 62(6), 1876–1883.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789–802. doi:10.1038/nrc1977
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry & Biology*, 17(5), 421–433. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012
- Pourquier, P., & Lansiaux, A. (2011). [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bulletin Du Cancer*, 98(11), 1287–1298. doi:10.1684/bdc.2011.1474
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., & West, A. B. (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *The American Journal of Physiology*, 277(2 Pt 1), C183–201.
- Prasetyanti, P. R., Zimmerlin, C. D., Bots, M., Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., & Medema, J. P. (2013). Regulation of stem cell self-renewal and differentiation by Wnt and Notch are conserved throughout the adenoma-carcinoma sequence in the colon. *Molecular Cancer*, 12(1), 1–1. doi:10.1186/1476-4598-12-126
- Pribluda, A., Elyada, E., Wiener, Z., Hamza, H., Goldstein, R. E., Biton, M., et al. (2013). A Senescence-Inflammatory Switch from Cancer-Inhibitory to Cancer-Promoting Mechanism. *Cancer Cell*, 1–15. doi:10.1016/j.ccr.2013.06.005
- Qin, B., Gao, B., Yu, J., Yuan, J., & Lou, Z. (2013). Ataxia telangiectasia-mutated- and Rad3-related protein regulates the DNA damage-induced G2/M checkpoint through the Aurora A cofactor Bora protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 16139–16144. doi:10.1074/jbc.M113.456780

- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., & Morrison, S. J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456(7222), 593–598. doi:10.1038/nature07567
- Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 307(5717), 1904–1909. doi:10.1126/science.1104815
- Rampino, N. (1997). Somatic Frameshift Mutations in the BAX Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype. *Science*, 275(5302), 967–969. doi:10.1126/science.275.5302.967
- Ravid, D., Maor, S., Werner, H., & Liscovitch, M. (2004). Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene*, 24(8), 1338–1347. doi:10.1038/sj.onc.1208337
- Real, P. J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J. C., Lopez-Vega, J. M., & Fernandez-Luna, J. L. (2002). Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*, 21(50), 7611–7618. doi:10.1038/sj.onc.1206004
- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Zhang, Y. W., Ji, J., Bonner, W. M., Kinders, R. J., et al. (2010). Histone H2AX and Poly(ADP-Ribose) as Clinical Pharmacodynamic Biomarkers. *Clinical Cancer Research*, 16(18), 4532–4542. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0523
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., & Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), 162–169.
- Reedijk, M., Odorcic, S., Zhang, H., Chetty, R., Tennert, C., Dickson, B. C., et al. (2008). Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*, 33(6), 1223–1229. doi:10.3892/ijo_00000112
- Reginato, M. J., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., et al. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature Cell Biology*, 5(8), 733–740. doi:10.1038/ncb1026
- Reinhardt, H. C., & Yaffe, M. B. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 245–255. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.018
- Ren, H., Koo, J., Guan, B., Yue, P., Deng, X., Chen, M., et al. (2013). The E3 ubiquitin ligases β -TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. *Molecular Cancer*, 12, 146. doi:10.1186/1476-4598-12-146
- Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimmer-Strobl, U., et al. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Reports*, 9(4), 377–383. doi:10.1038/embor.2008.7
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556. doi:10.1083/jcb.201009094
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., et al. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973–979. doi:10.1038/ncb1909
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858
- Rossetto, D., Truman, A. W., Kron, S. J., & Cote, J. (2010). Epigenetic Modifications in Double-Strand Break DNA Damage Signaling and Repair. *Clinical Cancer Research*, 16(18), 4543–4552. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0513

- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., et al. (2012). Identification of a cKit⁺ Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5⁺ Stem Cells in Mice. *Ygast*, 142(5), 1195–1205.e6. doi:10.1053/j.gastro.2012.02.006
- Roulston, A., Muller, W. J., & Shore, G. C. (2013). BIM, PUMA, and the Achilles' Heel of Oncogene Addiction. *Science Signaling*, 6(268), pe12–pe12. doi:10.1126/scisignal.2004113
- Sachdev, D., Zhang, X., Matise, I., Gaillard-Kelly, M., & Yee, D. (2010). The type I insulin-like growth factor receptor regulates cancer metastasis independently of primary tumor growth by promoting invasion and survival. *Oncogene*, 29(2), 251–262. doi:10.1038/onc.2009.316
- Sakurikar, N., Eichhorn, J. M., & Chambers, T. C. (2012). Cyclin-dependent Kinase-1 (Cdk1)/Cyclin B1 Dictates Cell Fate after Mitotic Arrest via Phosphoregulation of Antiapoptotic Bcl-2 Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 39193–39204. doi:10.1074/jbc.M112.391854
- Sakurikar, N., Eichhorn, J. M., Alford, S. E., & Chambers, T. C. (2013). Identification of a mitotic death signature in cancer cell lines. *Cancer Letters*, 1–7. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.036
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39–85. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 695–723. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.092805
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, 40(7), 915–920. doi:10.1038/ng.165
- Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*, 340(6137), 1190–1194. doi:10.1126/science.1234852
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. doi:10.1038/nature07935
- Satoh, T., Yasui, H., Muro, K., Komatsu, Y., Sameshima, S., Yamaguchi, K., & Sugihara, K. (2013). Pharmacokinetic assessment of irinotecan, SN-38, and SN-38-glucuronide: a substudy of the FIRIS study. *Anticancer Research*, 33(9), 3845–3853.
- Sánchez-Tilló, E., Fanlo, L., Siles, L., Montes-Moreno, S., Moros, A., Chiva-Blanch, G., et al. (2013). The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma. *Cell Death and Differentiation*. doi:10.1038/cdd.2013.123
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., et al. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(20), 3429–3456. doi:10.1007/s00018-012-1122-2
- Scartozzi, M., Mandolesi, A., Giampieri, R., Pierantoni, C., Loupakakis, F., Zaniboni, A., et al. (2010). Insulin-like growth factor 1 expression correlates with clinical outcome in K-RAS wild type colorectal cancer patients treated with cetuximab and irinotecan. *International Journal of Cancer*, 127(8), 1941–1947. doi:10.1002/ijc.25193
- Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H.-J., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., et al. (2011). Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell*, 145(6), 926–940. doi:10.1016/j.cell.2011.04.029

- Schlüter, K., Gassmann, P., Enns, A., Korb, T., Hempling-Bovenkerk, A., Hölzen, J., & Haier, J. (2006). Organ-Specific Metastatic Tumor Cell Adhesion and Extravasation of Colon Carcinoma Cells with Different Metastatic Potential. *The American Journal of Pathology*, 169(3), 1064–1073. doi:10.2353/ajpath.2006.050566
- Schmiegel, W., Pox, C., Reinacher-Schick, A., Adler, G., Arnold, D., Fleig, W., et al. (2010). S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). (Vol. 48, pp. 65–136). Presented at the Zeitschrift für Gastroenterologie. doi: 10.1055/s-0028-1109936
- Schmitt, C. A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1775(1), 5–20. doi:10.1016/j.bbcan.2006.08.005
- Schmoll, H.-J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., et al. (2012). ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*, 23(10), 2479–2516. doi:10.1093/annonc/mds236
- Schuijers, J., & Clevers, H. (2012). Focus ReviewAdult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *The EMBO Journal*, 31(12), 2685–2696. doi:10.1038/emboj.2012.149
- Senovilla, L., Vitale, I., Galluzzi, L., Vivet, S., Joza, N., Younes, A. B., et al. (2009). p53 represses the polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(9), 1380–1385.
- Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H., & Choi, E. J. (1996). A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature*, 381(6585), 804–806. doi: 10.1038/381804a0
- Siebzehnruhl, F. A., Silver, D. J., Tugertimur, B., Deleyrolle, L. P., Siebzehnruhl, D., Sarkisian, M. R., et al. (2013). The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine*. doi:10.1002/emmm.201302827
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741–4751. doi: 10.1038/onc.2010.215
- Singh, A., Sweeney, M. F., Yu, M., Burger, A., Greninger, P., Benes, C., et al. (2012). TAK1 Inhibition Promotes Apoptosis in KRAS-Dependent Colon Cancers. *Cell*, 148(4), 639–650. doi:10.1016/j.cell.2011.12.033
- Slee, E. A., & Lu, X. (2003). The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicology Letters*, 139(2-3), 81–87.
- Smit, M. A., & Peeper, D. S. (2011). Zeb1 is required for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and metastasis. *Oncogene*, 30(35), 3735–3744. doi:10.1038/onc.2011.96
- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J. V., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., et al. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9433–9438. doi:10.1073/pnas.122612899
- Smits, V. A., Klomp maker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A., & Medema, R. H. (2000). Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nature Cell Biology*, 2(9), 672–676. doi:10.1038/35023629
- Snippert, H. J., Schepers, A. G., van Es, J. H., Simons, B. D., & Clevers, H. (2013). Biased competition between Lgr5 intestinal stem cells driven by oncogenic mutation induces clonal expansion. *EMBO Reports*, 15(1), 62–69. doi:10.1002/embr.201337799

- Söreide, K., Janssen, E. A. M., Söiland, H., Körner, H., & Baak, J. P. A. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 93(4), 395–406. doi:10.1002/bjs.5328
- St Clair, S., & Manfredi, J. J. (2006). The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(7), 709–713.
- Stange, D. E., & Clevers, H. (2013). Concise review: The Yin and Yang of intestinal (cancer) stem cells and their progenitors. *Stem Cells*, 31(11), 2287–2295. doi:10.1002/stem.1475
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., IWABUCHI, K., Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Research*, 64(7), 2390–2396.
- Sugrue, M. M., Shin, D. Y., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (1997). Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9648–9653.
- Sulli, G., Di Micco, R., & d'Adda di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 709–720. doi:10.1038/nrc3344
- Sullivan, A., & Lu, X. (2007). ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *British Journal of Cancer*, 96(2), 196–200. doi:10.1038/sj.bjc.6603525
- Sunters, A., Fernández de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J. J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C. A., et al. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49795–49805. doi:10.1074/jbc.M309523200
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., & Miura, M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene*, 17(8), 931–939. doi:10.1038/sj.onc.1202021
- Syljuåsen, R. G. (2007). Checkpoint adaptation in human cells. *Oncogene*, 26(40), 5833–5839. doi:10.1038/sj.onc.1210402
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2013). Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a008706–a008706. doi:10.1101/cshperspect.a008706
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion Between Intestinal Stem Cell Populations in Distinct Niches. *Science*, 334(6061), 1420–1424. doi:10.1126/science.1213214
- Tanno, B., Sesti, F., Cesi, V., Bossi, G., Ferrari-Amorotti, G., Bussolari, R., et al. (2010). Expression of Slug Is Regulated by c-Myb and Is Required for Invasion and Bone Marrow Homing of Cancer Cells of Different Origin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), 29434–29445. doi:10.1074/jbc.M109.089045
- Terrano, D. T., Upreti, M., & Chambers, T. C. (2010). Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30(3), 640–656. doi:10.1128/MCB.00882-09
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.e5. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142. doi:10.1038/nrm1835

- Thiriet, C., & Hayes, J. J. (2005). Chromatin in Need of a Fix: Phosphorylation of H2AX Connects Chromatin to DNA Repair. *Molecular Cell*, 18(6), 617–622. doi:10.1016/j.molcel.2005.05.008
- Tian, C., & Liu, J. (2013). Repulsive guidance molecules (RGMs) and neogenin in bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *Molecular Reproduction and Development*, n/a–n/a. doi:10.1002/mrd.22199
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2012). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–259. doi:10.1038/nature10408
- Timofeev, O., Cizmecioglu, O., Settele, F., Kempf, T., & Hoffmann, I. (2010). Cdc25 Phosphatases Are Required for Timely Assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M Transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(22), 16978–16990. doi:10.1074/jbc.M109.096552
- Topham, C. H., & Taylor, S. S. (2013). Mitosis and apoptosis: how is the balance set? *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), 780–785. doi:10.1016/j.ceb.2013.07.003
- Tsvetkov, L., & Stern, D. F. (2005). Phosphorylation of Plk1 at S137 and T210 is inhibited in response to DNA damage. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(1), 166–171.
- Tu, K., Zheng, X., Zhou, Z., Li, C., Zhang, J., Gao, J., et al. (2013). Recombinant Human Adenovirus-p53 Injection Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Mediated by p53-Fbxw7 Pathway, Which Controls c-Myc and Cyclin E. *PLoS ONE*, 8(7), e68574. doi:10.1371/journal.pone.0068574.g006
- Ulrich, F., & Heisenberg, C.-P. (2009). Trafficking and Cell Migration. *Traffic*, 10(7), 811–818. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00929.x
- Utlei, R. T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., & Cote, J. (2005). Regulation of NuA4 Histone Acetyltransferase Activity in Transcription and DNA Repair by Phosphorylation of Histone H4. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8179–8190. doi:10.1128/MCB.25.18.8179-8190.2005
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024
- Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W. M., & van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, 118(4), 409–418. doi:10.1016/j.cell.2004.08.005
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Combaret, V., et al. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Ccell*, 6(6), 625–630. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.033
- Valvezan, A. J., Zhang, F., Diehl, J. A., & Klein, P. S. (2012). Adenomatous Polyposis Coli (APC) Regulates Multiple Signaling Pathways by Enhancing Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 3823–3832. doi:10.1074/jbc.M111.323337
- van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, 10(5), 389–399. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.027
- van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D. E., et al. (2009). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell*, 136(5), 903–912. doi:10.1016/j.cell.2009.01.031
- van der Waal, M. S., Hengeveld, R. C. C., van der Horst, A., & Lens, S. M. A. (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1407–1420. doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.015
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., et al. (2005). Notch/γ-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and

- adenomas into goblet cells. *Nature Cell Biology*, 435(7044), 959–963. doi:10.1038/nature03659
- van Vugt, M. A. T. M., & Medema, R. H. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, 24(17), 2844–2859. doi:10.1038/sj.onc.1208617
- Vermeulen, L., & Snippert, H. J. (2014). Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nature Reviews Cancer*, 14(7), 468–480. doi:10.1038/nrc3744
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, 12(5), 468–476. doi:10.1038/ncb2048
- Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M. R., Kemper, K., Perez Alea, M., et al. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci*, 105(36), 13427–13432. doi:10.1073/pnas.0805706105
- Vigneron, A. (2005). Src Inhibits Adriamycin-Induced Senescence and G2 Checkpoint Arrest by Blocking the Induction of p21waf1. *Cancer Research*, 65(19), 8927–8935. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0461
- Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., & Coqueret, O. (2006). The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 34742–34750. doi:10.1074/jbc.M602492200
- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M. J., et al. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302(5647), 1036–1038. doi:10.1126/science.1090072
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. doi:10.1038/nature09781
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Publishing Group*, 12(6), 385–392. doi:10.1038/nrm3115
- Voorneveld, P. W., Kodach, L. L., Jacobs, R. J., Liv, N., Zonneville, A. C., Hoogenboom, J. P., et al. (2014). Loss of SMAD4 Alters BMP Signaling to Promote Colorectal Cancer Cell Metastasis via Activation of Rho and ROCK. *Ygast*, 147(1), 196–208.e13. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.052
- Voskas, D., Ling, L. S., & Woodgett, J. R. (2014). Signals controlling un-differentiated states in embryonic stem and cancer cells: role of the phosphatidylinositol 3' kinase pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 229(10), 1312–1322. doi:10.1002/jcp.24603
- Waite, K. A., & Eng, C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF- β family. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 763–773. doi:10.1038/nrg1178
- Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., & Green, M. R. (2008). Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*, 132(3), 363–374. doi:10.1016/j.cell.2007.12.032
- Wang, J. C. Y., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*, 15(9), 494–501. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.004
- Wang, L., Ye, X., Liu, Y., Wei, W., & Wang, Z. (2014a). Aberrant regulation of FBW7 in cancer. *Oncotarget*, 5(8), 2000–2015.
- Wang, W.-L., Huang, H.-C., Kao, S.-H., Hsu, Y.-C., Wang, Y.-T., Li, K.-C., et al. (2014b). Slug is temporally regulated by cyclin E in cell cycle and controls genome stability. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2014.58

- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A. S., et al. (2009). Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells Is Linked with Activation of the Notch Signaling Pathway. *Cancer Research*, 69(6), 2400–2407. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4312
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47759–47762. doi:10.1074/jbc.C100569200
- Wen, K., Fu, Z., Wu, X., Feng, J., Chen, W., & Qian, J. (2013). Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: Effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Letters*, 333(1), 56–65. doi:10.1016/j.canlet.2013.01.009
- Wendt, M. K., Smith, J. A., & Schiemann, W. P. (2010). Transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene*, 29(49), 6485–6498. doi:10.1038/onc.2010.377
- Wu, C.-C., Yang, T.-Y., Yu, C.-T. R., Phan, L., Ivan, C., Sood, A. K., et al. (2012). p53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(18), 3433–3442. doi:10.4161/cc.21732
- Wu, W. K. K., Wang, X. J., Cheng, A. S. L., Luo, M. X. M., Ng, S. S. M., To, K. F., et al. (2013). Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 86(3), 251–277. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.11.009
- Wunderlich, M., & Berberich, S. J. (2002). Mdm2 inhibition of p53 induces E2F1 transactivation via p21. *Oncogene*, 21(28), 4414–4421. doi:10.1038/sj.onc.1205541
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., et al. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature Immunology*, 9(4), 405–414. doi:10.1038/ni1575
- Yan, W., & Chen, X. (2009). Identification of GRO1 as a Critical Determinant for Mutant p53 Gain of Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12178–12187. doi:10.1074/jbc.M900994200
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., et al. (2004). Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*, 117(7), 927–939. doi:10.1016/j.cell.2004.06.006
- Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., & Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 294(5549), 2155–2158. doi:10.1126/science.1065718
- Ye, C., Zhang, X., Wan, J., Chang, L., Hu, W., Bing, Z., et al. (2013). Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(9), 1424–1432. doi:10.4161/cc.24528
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
- You, H. (2006). FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1657–1663. doi:10.1084/jem.20060353
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Publishing Group*, 9(1), 47–59. doi:10.1038/nrm2308
- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 97–105. doi:10.1038/nrc1275
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell*, 7(3), 673–682.

- Zeki, S. S., Graham, T. A., & Wright, N. A. (2011). Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, 8(2), 90–100. doi:10.1038/nrgastro.2010.211
- Zeuner, A., Francescangeli, F., Contavalli, P., Zapparelli, G., Apuzzo, T., Eramo, A., et al. (2014). Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-XL inhibition in non-small cell lung cancer. *Cell Death and Differentiation*. doi:10.1038/cdd.2014.105
- Zhang, B., Halder, S. K., Kashikar, N. D., Cho, Y. J., Datta, A., Gorden, D. L., & Datta, P. K. (2009). Anti-metastatic Role of Smad4 Signaling in Colorectal Cancer. *Ygast*, 1–41. doi:10.1053/j.gastro.2009.11.004
- Zhang, W., Zong, C. S., Hermanto, U., Lopez-Bergami, P., Ronai, Z., & Wang, L. H. (2005). RACK1 Recruits STAT3 Specifically to Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors for Activation, Which Is Important for Regulating Anchorage-Independent Growth. *Molecular and Cellular Biology*, 26(2), 413–424. doi:10.1128/MCB.26.2.413-424.2006
- Zhang, Y., Li, B., Ji, Z.-Z., & Zheng, P.-S. (2010). Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer*, 116(22), 5207–5218. doi:10.1002/cncr.25449
- Zhou, Z., Cao, J.-X., Li, S.-Y., An, G.-S., Ni, J.-H., & Jia, H.-T. (2013). p53 Suppresses E2F1-dependent PLK1 expression upon DNA damage by forming p53-E2F1-DNA complex. *Experimental Cell Research*, 319(20), 3104–3115. doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.012
- Zhu, H., Chang, B.-D., Uchiumi, T., & Roninson, I. B. (2002). Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 1(1), 59–66.
- Zlobec, I., & Lugli, A. (2010). Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget*, 1(7), 651–661.
- Zou, J., Rezvani, K., Wang, H., Lee, K. S., & Zhang, D. (2013). BRCA1 downregulates the kinase activity of Polo-like kinase 1 in response to replication stress. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(14), 2255–2265. doi:10.4161/cc.25349

Thèse de Doctorat

Barbara JONCHERE

Echappement à la chimiothérapie et émergence de cellules plus agressives, importance de l'hétérogénéité tumorale

Chemotherapy escape and emergence of more aggressive cells, a critical role for tumoral heterogeneity

Résumé

Les dommages de l'ADN, induits par les traitements de chimiothérapie, sont responsables de l'induction de la sénescence, un arrêt définitif du cycle cellulaire dépendant des voies p53-p21 et p16-Rb. L'efficacité de cette suppression n'est pas optimale en raison d'une hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie. Dans cette étude, nous avons analysé l'échappement à la sénescence en réponse à l'irinotécan, un traitement des cancers colorectaux. Dans les cellules LS174T, le processus de sénescence est induit mais des cellules conservent leurs capacités prolifératives et l'exercent après l'élimination du traitement. Les cellules proliférantes (PLD) et sénescents (PLS) forment un mélange hétérogène appelé cellules persistantes (PLCs). Alors qu'elles sont constituées d'une part importante de cellules sénescents, les PLCs sont capables de former des tumeurs in vivo, de manière comparable aux cellules parentales. De façon intéressante, le traitement est également associé à l'augmentation de l'agressivité caractérisée par la croissance en faible adhérence. L'émergence des PLD et la résistance à l'anoikis sont dépendantes de l'expression des protéines Mcl-1, Bcl-xL et p21. L'enrichissement des PLD et PLS, réalisé par cytométrie en flux, a permis d'identifier les PLS comme nécessaires à la résistance à l'anoikis. Les PLS pourraient donc créer un environnement favorable à la transformation de cellules non touchées par le traitement. Alors que le rôle de Mcl-1 et Bcl-xL dans chaque population reste à déterminer, l'utilisation d'inhibiteurs de ces protéines combinés à l'irinotécan pourrait limiter l'hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie et l'agressivité tumorale.

Mots clés : chimiothérapie, sénescence, irinotécan, chimiorésistance, cancer colorectal.

Abstract

Activated by chemotherapy, senescence is a suppressive response which prevents cell cycle progress through activation of the p53-p21 and p16-Rb signaling pathways. However, despite the efficiency of this suppression, cancer cells can emerge to induce clinical relapse. In this study, we analyzed senescence escape in response to irinotecan, one of the first line treatment used in colorectal cancer. After treatment, senescence is induced in LS174T cell but a subpopulation of cells finally resume proliferation. Persistent cells (PLCs) are composed of an heterogeneous mixture of senescent (PLS) and dividing cells (PLD). In spite of PLS, PLCs are able to grow in vivo as efficiently as parental LS174T cells. Importantly, persistence induced the emergence of more transformed cells characterized by the ability to grow in low adhesion conditions. PLD emergence and anoikis resistance depend on Mcl-1, Bcl-xL and p21. PLD and PLS enrichment, by flow cytometry, allowed us to identify PLS as essential for anoikis resistance. Our results suggest that PLS establish a favorable environment for the transformation of unaffected cells. Mcl-1 and Bcl-xL role in each population remains to be determined, but inhibitors of these protein used in combination with irinotecan should restrict the heterogeneity of the response and tumoral aggressiveness.

Key Words : chemotherapy, senescence, irinotecan, chemoresistance, colorectal cancer.